

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-6 PLASMÁTICA E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
INDICADORES DE DECH AGUDA PÓS-
TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO**

TESE DE DOUTORADO

MARIELA GRANERO FARIAS

Porto Alegre, Brasil

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-6 PLASMÁTICA E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
INDICADORES DE DECH AGUDA PÓS-
TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO**

MARIELA GRANERO FARIAS

ORIENTADORA: PROF^A LIANE ESTEVES DAUDT

**A apresentação desta tese é exigência
do Programa de Pós-Graduação em
Saúde da Criança e do Adolescente, da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título de Doutor.**

Porto Alegre, Brasil

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

22/03/2019

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.^a Dra. Laura Maria Fogliatto

Universidade de Ciências Médicas da Saúde de Porto Alegre

Prof.^a Dra. Mariana Bohns Michalowski

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Lauro Jose Gregianin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Granero Farias, Mariela

Avaliação dos níveis de IL-6 plasmática e polimorfismos genéticos como indicadores de DECH aguda pós-transplante de células tronco hematopoéticas alogênicas / Mariela Granero Farias. -- 2019. 209 f.

Orientadora: Liane Esteves Daudt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Transplante de células tronco hematopoéticas. 2. Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda. 3. Polimorfismos. 4. Biomarcadores. 5. IL-6. I. Esteves Daudt, Liane, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço de forma especial à minha orientadora Liane Esteves Daudt pela dedicação e paciência. Pelo conhecimento transmitido e pelo crescimento que me proporcionou nesses últimos anos.

Às alunas de iniciação científica Bruna de Mello Vicente e Muriel Habigzang pela dedicação ao projeto, pelo carinho e pelas palavras de incentivo durante esses quatro anos de trabalho.

À Camila Andrade dos Santos pelo comprometimento e dedicação no auxílio da realização da técnica de PCR e colaboração no trabalho.

Ao colega Iuri Vicente Camargo Morkis pela participação em todas as etapas do trabalho e auxílio em todas as questões referentes à pesquisa.

À Bianca Pfaffenseller, Leonardo Lazzaron Cenatti e Letícia Terres Rodrigues pela contribuição na técnica de dosagem das citocinas.

À Natalia Emerim Lemos, Cristine Dieter e Alice Pinheiro Machado pela ajuda desde o princípio do trabalho, e por transmitirem seus conhecimentos na área de biologia molecular.

Aos médicos, enfermeiros e residentes da Unidade de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por auxiliarem no acesso ao material biológico e informações necessárias para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), principalmente a Patricia Koehler dos Santos pelo auxílio em todos os momentos que necessitamos de algum esclarecimento em biologia molecular.

Aos funcionários do laboratório de Genética, especialmente a Sandra Leistner Segal, pela ajuda e apoio na realização das técnicas moleculares.

À Vania Naomi Hirakata pela paciência, pelas sugestões, pela dedicação ao seu trabalho e por todo o seu conhecimento em análises estatísticas, que certamente contribuíram para melhorar e finalização deste trabalho.

À Priscila de Oliveira da Silva pelo apoio e contribuição nas informações a respeito das amostras, levantamento de dados e apoio.

Aos colegas da Unidade Diagnóstico Especializado, pela compreensão em momentos em que necessitei me ausentar, pelo apoio e incentivo.

À Alessandra Paz pelo tempo dedicado a leitura dos meus artigos e pela grande contribuição através das suas sugestões que certamente levaram a uma melhoria na finalização deste trabalho.

À minha colega Cláudia Rosa Cagliari que esteve sempre presente, dando apoio, força e pelas palavras amigas que sempre aliviaram os momentos mais difíceis.

À minha família pelo apoio, força e incentivo em todos os momentos na elaboração deste trabalho e na busca de todos os meus objetivos. Pelo profissionalismo, integridade e competência, que sempre serviram de exemplo, para minha atuação como aluno e profissional.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo incentivo a pesquisa e por proporcionarem o desenvolvimento de alunos e profissionais.

À instituição fomentadora de pesquisa FIPE/HCPA, pelo apoio e contribuição na realização dos projetos de pesquisa.

A todos que participaram de maneira direta ou indireta nesta jornada e que de alguma forma contribuíram para que ela fosse viável.

E a Deus, por guiar os meus passos e sempre mostrar o melhor caminho a ser seguido.

“A grandeza não é onde permanecemos,
mas em qual direção estamos nos movendo.

Devemos navegar algumas vezes
Com o vento e outras vezes contra ele,
Mas devemos navegar,
E não ficar à deriva, e nem ancorados.”

Oliver Wendell Holmes

RESUMO

Introdução: O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica de grande utilidade em uma série de doenças hematológicas e imunológicas. Embora grandes avanços tenham ocorrido, nos últimos anos, a doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa) é a maior causa de morbidade e mortalidade. **Objetivo:** o estudo das citocinas e dos polimorfismos dos genes produtores destas proteínas pode ser útil para o entendimento da DECHa. **Materiais e métodos:** Neste estudo foi avaliado o nível de IL-6, por citometria de fluxo, em crianças e adultos, em diferentes momentos, pré TCTH-alo, e nos dias 7, 14, 28, 60 e 100. Também foi realizado o estudo dos polimorfismos nos genes produtores das IL-6 -174, INF- γ +874, TNF- α -238 e -308, IL-10 -1082, -819 e -592. **Resultados:** Encontramos elevação dos níveis da IL-6 nos dias 7 e 14 após o TCTH. O grupo pediátrico sem DECH apresenta níveis mais elevados de IL-6 em relação aos com DECH e o genótipo GG da IL-6 é um alto produtor da citocina plasmática, o que não foi evidenciado nos adultos. Em relação aos demais polimorfismos, encontramos que o genótipo AA da IL-10 -1082 está relacionado com ausência e GG com o risco de DECHa. Os pacientes que realizaram o TCTH haploidêntico apresentam níveis mais elevados de IL-6 comparado com os outros tipos de transplantes. **Conclusão:** Medidas de proteínas expressas, diferentemente, no plasma permitem um diagnóstico acurado de complicações do TCTH-alo e o estudo dos genótipos da IL-10 1082 pode ser útil como preditor da DECHa, auxiliando na prevenção da doença e estratificação dos pacientes de acordo com a resposta a terapia.

Palavras-Chave: Transplante de Células Tronco Hematopoéticas; DECH aguda; IL-6; IL-10; INF- γ ; TNF- α ; bloqueadores; biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a very useful therapeutic modality in a series of hematological and immunological diseases. Although major advances have occurred in recent years, acute graft-versus-host disease (a-GVHD) is the major cause of morbidity and mortality. **Objective:** the study of cytokines and the polymorphisms of genes that produce these proteins may be useful for understanding of a-GVHD. **Materials and methods:** In this study, the level of IL-6 was assessed by flow cytometry, in children and adults, at different times of allo-HSCT, after and on days 7, 14, 28, 60 and 100. Also polymorphisms in IL-6 -174, INF- γ +874, TNF- α -238 and -308, IL-10 -1082, -819 and -592 genes were studied. **Results:** We found elevation of IL-6 levels on days 7 and 14 after HSCT. The pediatric group without GVHD has higher levels of IL-6 than those without GVHD, this was not evident in adults. It has also been found that the IL-6 GG genotype is a high producer of plasma cytokine. In relation to the other polymorphisms we found that the AA genotype of IL-10 -1082 is related to absence and GG with the risk of a-GVHD. Patients who underwent haploidentical HSC had higher levels of IL-6 compared to other types of transplants. **Conclusion:** Differential expressed plasma proteins measurements allow accurate diagnosis of HSCT complications, and the study of IL-10 1082 genotypes may be useful as a predictor of a-GVHD, helping to prevent disease and stratification of patients according to the response to therapy.

Key Words: Hematopoietic stem cell transplantation; acute GVHD; IL-6; IL-10; INF- γ ; TNF- α ; blockers; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Esquema de desenvolvimento da hematopoese	23
Figura 2 — Reconhecimento de aloantígenos pela célula T	35
Figura 3 — Duplo sinal da ligação entre células linfoides T e CAA	37
Figura 4 — Patofisiologia da DECH aguda	46
Figura 5 — Localização do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no braço curto cromossomo 6	54
Figura 6 — Atividade pleiotrópica da IL-6. Funções da IL-6 em diferentes tipos celulares e órgãos	76
Figura 7 — Via clássica e trans-sinalização da IL-6	81
Figura 8 — Transdução de sinal da IL-6	83
Figura 9 — Diferenciação das células T <i>naive</i> em células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias ..	87
Figura 10 — Bloqueio da sinalização da IL-6 pelo anticorpo anti-IL-6R	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Doenças tratadas com TCTH-alogênico	26
Tabela 2 — Classificação de DECH baseada no consenso NIH 2005	30
Tabela 3 — Estágios de DECH	50
Tabela 4 — Graus de DECH	51
Tabela 5 — Critério do IBMTR para o índice de DECH aguda	51
Tabela 6 — Frequência (%) dos genótipos da <i>IL-10</i> e distribuição dos alelos em diferentes populações.....	67
Tabela 7 — Frequências (%) dos genótipos da <i>IL-6</i> -174 G/C e distribuição dos alelos em diferentes populações	68
Tabela 8 — Frequência (%) dos genótipos da <i>TNF-alfa</i> e distribuição dos alelos em diferentes populações.....	70
Tabela 9 — Frequência (%) dos genótipos da <i>INF-gama</i> e distribuição dos alelos em diferentes populações.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Genótipo AA
AAS	Amiloidose A do soro
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AG	Genótipo AG
AP-1	Proteína ativadora 1
AP-2	Proteína ativadora 2
AraC	Citarabina
ASC	Área de superfície corporal
AT	Haplótipo AT
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BSF	Fator estimulatório de célula B
B7	Membro da família B7
B7-1	Membro da família B7-1
B7-2	Membro da família B7-2
CAA	Célula apresentadora de antígeno
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CC	Genótipo CC
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCL19	<i>Chemokine ligand 19</i>
CCL21	<i>Chemokine ligand 21</i>
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CCR6	<i>C-C chemokine receptor type 6</i>
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD4	<i>Cluster de differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD25	<i>Cluster of differentiation 25</i>
CD28	<i>Cluster of differentiation 28</i>
CD30	<i>Cluster of differentiation 30</i>
CD30L	CD30 ligante

CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD40L	CD40 ligante
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
CD95L	CD95 ligante
CD126	<i>Cluster of differentiation 126</i>
CD130	<i>Cluster of differentiation 130</i>
CD134	<i>Cluster of differentiation 134</i>
CD137	<i>Cluster of differentiation 137</i>
CD153	<i>Cluster of differentiation 153</i>
CD154	<i>Cluster of differentiation 154</i>
CD178	<i>Cluster of differentiation 178</i>
CD279	<i>Cluster of differentiation 279</i>
CEBP-alfa	<i>Enhancer binding protein alpha</i>
c-kit	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMV	Citomegalovirus
CNTF	<i>Ciliar neurotrophic fator</i>
CSF	Fator estimulante de colônia
CT	Genótipo CT
CT-1	Cardiotropina 1
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
CTH	Célula tronco hematopoética
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DECHc	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRs	<i>Death receptors</i>
DVO	Doença veno oclusiva
ECM	Proteína de matriz extracelular

Fas	Receptor Fas
FasL	Ligante Fas
FLT-3	Receptor tipo <i>tyrosina kinase 3</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
GC	Genótipo GC
G-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos
GG	Genótipo GG
GI	Gastro-intestinal
gp80	Glicoproteína com peso molecular de 80kDa
gp130	Glicoproteína com peso molecular de 130kDa
GVL	<i>Graft-versus-leukemia</i>
HA-1	Antígeno menor de histocompatibilidade-1
HA-2	Antígeno menor de histocompatibilidade-2
HA-Y	Antígeno menor de histocompatibilidade do cromossomo Y
HA-3	Antígeno menor de histocompatibilidade-3
HA-5	Antígeno menor de histocompatibilidade-5
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLA A	<i>Human leukocyte antigen</i> : Antígeno leucocitário humano codificado pelo locus A
HLA B	Antígeno leucocitário humano codificado pelo locus B
HLA C	Antígeno leucocitário humano codificado pelo locus C
HLADR	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related</i>
HLA classe I	<i>Human leukocyte antigen class I</i>
HLA classe II	<i>Human leukocyte antigen class II</i>
HLADR	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related</i>
HLADR2	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related 2</i>
HLADR3	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related 3</i>
HLADR4	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related 4</i>
HLADRB1	<i>Human leukocyte antigen – antigen D Related beta 1 chain</i>
HLADP	<i>Human leukocyte antigen – antigen P Related</i>
HLADQ	<i>Human leukocyte antigen – antigen Q Related</i>
HLA-DQB1	<i>Human leukocyte antigen – antigen Q Related beta 1 chain</i>

HSPG	Heparan sulfato proteogligano
HMGB1	Proteína de alta mobilidade grupo box-1
ICOS	<i>Inducible costimulator</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IgA	Imunoglobulina A
IgG1	Classe de imunoglobulina G1
IL-1	Interleucina 1
IL-1alfa	Interleucina 1 alfa
IL-1beta	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-35	Interleucina 35
IL-6R	Receptor de IL-6
INF	Interferon
INF-gama	Interferon gama
INF-gama*2	Interferon gama receptor 2
JAK	<i>Janus Kinase</i>
K ₂ EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético dipotássio
KDR	Receptor de domínio <i>kinase</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LFA-2	<i>Lymphocyte function-associated antigen 2</i>
LGG	Linfócitos grandes granulares
LIF	Fator inibitório de leucemia
LPS	Lipopolissacarídeos
mHAs	Antígenos menores de histocompatibilidade

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
mIL-6R	Receptor de membrana da IL-6
mRNA	RNA mensageiro
MO	Medula óssea
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NIH	<i>National Institute for Health</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMDP	<i>National Marrow Donor Program</i>
OM	Oncostatina M
ON	Óxido nítrico
OX40	OX40 receptor
OX40L	OX40 ligante
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PAMPs	Padrão molecular associado a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
RIC	Condicionamento de intensidade reduzida
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SCU	Sangue de cordão umbilical
sgp130	Glicoproteína 130 solúvel
sIL-6R	Receptor solúvel da IL-6
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SOCS	Supressor da sinalização de citocina
SOCS1	Supressores da sinalização de citocina 1
SOCS3	Supressores da sinalização de citocina 3
SP	Sangue periférico
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>

TBI	<i>Total body irradiation</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TCTH	Transplante de células tronco hematopoéticas
TCTH-alo	Transplante de células tronco hematopoéticas alogênico
TGF-beta	<i>Transforming growth factor beta</i> (fator de crescimento transformador beta)
TGI	Trato gastro intestinal
Th0	Células T <i>helper</i> 0
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
Th17	Células T <i>helper</i> 17
Th22	Células T <i>helper</i> 22
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TNFd	<i>Tumor Necrosis Factor allele d</i> (Fator de Necrose Tumoral alelo d)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TNK	Células T <i>natural killer</i>
T Reg	Células T regulatórias
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TT	Genótipo TT
TWEAK	<i>Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
VEGF	Vascular endothelial growth fator-fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 FUNÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CÉLULA TRONCO HEMATOPOÉTICA	22
2.2 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	24
2.3 HISTÓRIA DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO.....	27
2.4 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO.....	29
2.4.1 Patofisiologia da DECH aguda	30
2.4.1.1 Fase aferente.....	31
2.4.1.1.1 Fase 1: Dano tecidual no hospedeiro devido ao regime de condicionamento e ativação das CAA	31
2.4.1.1.2 Fase 2: Ativação das células T do doador (Indução e fase de expansão)	33
2.4.1.1.3 Coestimulação.....	35
2.4.1.1.4 Citocinas e diferenciação das células T	38
2.4.1.2 Fase eferente.....	40
2.4.1.2.1 Fase 3: Fase efetora inflamatória e celular.....	40
2.4.1.2.2 Efetores inflamatórios.....	41
2.4.1.2.3 Efetores celulares	43
2.4.2 Manifestações clínicas	46
2.4.2.1 Lesões de pele	47
2.4.2.2 Trato gastro-intestinal.....	48
2.4.2.3 Fígado.....	48
2.4.2.4 Sistema hematopoético.....	49
2.4.2.5 Outros órgãos	49
2.4.3 Estágios e graus de DECH	49
2.4.4 Fatores Preditivos de DECHa.....	51
2.4.4.1 Fatores HLA-dependentes	52
2.4.4.2 Doadores do sexo feminino e receptores masculinos.....	55
2.4.4.3 Multiparidade nos doadores	55
2.4.4.4 Regime de condicionamento	55
2.4.4.5 Quimerismo	56
2.4.4.6 Infecções.....	56
2.4.4.7 Idade	56
2.4.4.8 Fonte de células	57
2.5 REGIME DE CONDICIONAMENTO	58
2.5.1 Regime de condicionamento de altas doses	58
2.5.1.1 Regime de irradiação corporal total	58
2.5.1.2 Regime baseado em altas doses de quimioterapia (mieloablativo).....	59
2.5.2 Regime de condicionamento não mieloablativo e intensidade reduzida.....	60
2.6 EFEITO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA	61
2.7 BIOMARCADORES	61

2.7.1	Genes inflamatórios/imunoreguladores.....	62
2.7.1.1	Gene da <i>Interleucina-10 (IL-10)</i>	63
2.7.1.2	Gene do <i>Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa)</i>	64
2.7.1.3	Gene do <i>Interferon gama (INF-gama)</i>	65
2.7.1.4	Gene da <i>Interleucina-6 (IL-6)</i>	66
2.7.2	Varição étnica dos polimorfismos dos genes das citocinas.....	66
2.7.3	Citocinas	71
2.7.3.1	Interleucina-10 (IL-10).....	71
2.7.3.2	Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa).....	73
2.7.3.3	Interferon gama (INF-gama)	73
2.7.3.4	Interleucina-6 (IL-6).....	75
2.8	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MECANISMOS DA IL-6	77
2.8.1	Vias de sinalização da IL-6	77
2.8.1.1	Receptores de membrana (Via clássica).....	77
2.8.1.2	Receptores solúveis (Trans-sinalização)	79
2.8.1.3	Outra via de sinalização	80
2.8.2	Regulação da expressão de IL-6	81
2.8.2.1	Ativação.....	81
2.8.2.2	Inibição.....	82
2.8.3	Efeitos da IL-6.....	83
2.8.3.1	Efeito da IL-6 no processo pró-inflamatório	83
2.8.3.2	Efeito da IL-6 no processo anti-inflamatório	84
2.8.3.3	Efeito da IL-6 nas células imunocompetentes.....	85
2.8.3.4	Regulação da CTH e regeneração tecidual.....	87
2.8.3.5	Efeito neurológico da IL-6	87
2.8.4	Bloqueador da IL-6.....	88
3	JUSTIFICATIVA	91
4	OBJETIVOS.....	92
4.1	OBJETIVO GERAL.....	92
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	92
5	MATERIAIS E MÉTODOS	93
5.1	TIPO DE ESTUDO	93
5.2	CAMPO DE ESTUDO	93
5.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA	93
5.3.1	Cálculo amostral	94
5.4	METODOLOGIA	94
5.4.1	Dosagem de citocinas.....	94
5.4.2	Análise molecular.....	94
5.4.3	Exames bioquímicos	95
5.4.4	Outros exames laboratoriais.....	95
5.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
6 ARTIGO 1	128
7 ARTIGO 2	153
8 ARTIGO 3	185
9 DISCUSSÃO.....	205
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	208

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopóéticas (TCTH) é uma potencial modalidade terapêutica usada no tratamento de doenças hematológicas e síndrome de falência medular (PASSWEG *et al.*, 2017). Há dois tipos de transplantes: TCTH autólogo, onde o paciente recebe a sua própria célula tronco, com uma forma de estratégia de quimioterapia de altas doses para erradicar a malignidade subjacente e o TCTH alogênico (TCTH-alo), onde a CTH e o repertório imunológico do doador são infundidos, no paciente, para estabelecer a hematopoese e a sua imunidade (SINGH; MCGUIRK, 2016).

Uma das principais complicações do TCTH-alo é a doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa). Esta é um processo biológico complexo, caracterizada por uma desregulação imune severa com processo inflamatório (ZEISER; SOCIÉ; BLAZAR, 2016). Estudos demonstram que um elevado número de citocinas inflamatórias, liberadas, durante o regime de condicionamento e período pós-transplante estão envolvidas na patofisiologia da DECHa. Uma das características mais marcantes da DECH é a presença de um ambiente pró-inflamatório que é atribuído ao regime de condicionamento, que induz dano tecidual, bem como a secreção de citocinas inflamatórias pela alo-reatividade das células T do doador e de outras populações de células efectoras (FERRARA, 2006; HILL *et al.*, 1997; XUN *et al.*, 1994). As citocinas perpetuam através do efeito citotóxico nos tecidos do hospedeiro, ativação e/ou preparação de células efectoras imunes e diferenciação de precursores de célula T *naive* na população de células T pró-inflamatórias T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 17 (Th17) (CARLSON *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2007).

Entre os fatores clínicos que podem levar a um risco aumentado de DECH estão: o baixo grau de compatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA), a fonte da CTH e

características do doador, porém, cada vez mais, fatores não relacionados ao sistema HLA estão ganhando destaque como preditores do risco de DECH e do resultado do transplante.

Testes laboratoriais genéticos ou avaliação dos níveis sanguíneos de citocinas têm sido utilizados como principais biomarcadores, pois polimorfismos, na região regulatória dos genes produtores de citocinas, podem causar diferenças interindividuais na produção destas proteínas, tendo forte influência nos níveis de transcrição do gene e impacto no aumento da produção e atividade das proteínas, sugerindo um possível fator de risco para a suscetibilidade e severidade de algumas doenças, incluindo a DECH (PAPANICOLAOU *et al.*, 1998). Entre os genes mais estudados estão os genes produtores de *Interleucina 10 (IL-10)*, *Interleucina 6 (IL-6)*, *Interferon gama (INF-gama)* e *Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa:Tumor Necrosis Fator-alpha)*.

Em síntese, considera-se que a avaliação dos níveis plasmáticos das citocinas e o estudo dos genes produtores destas proteínas podem ser úteis para a melhor compreensão do seu mecanismo no TCTH e estipular estratégias terapêuticas apropriadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

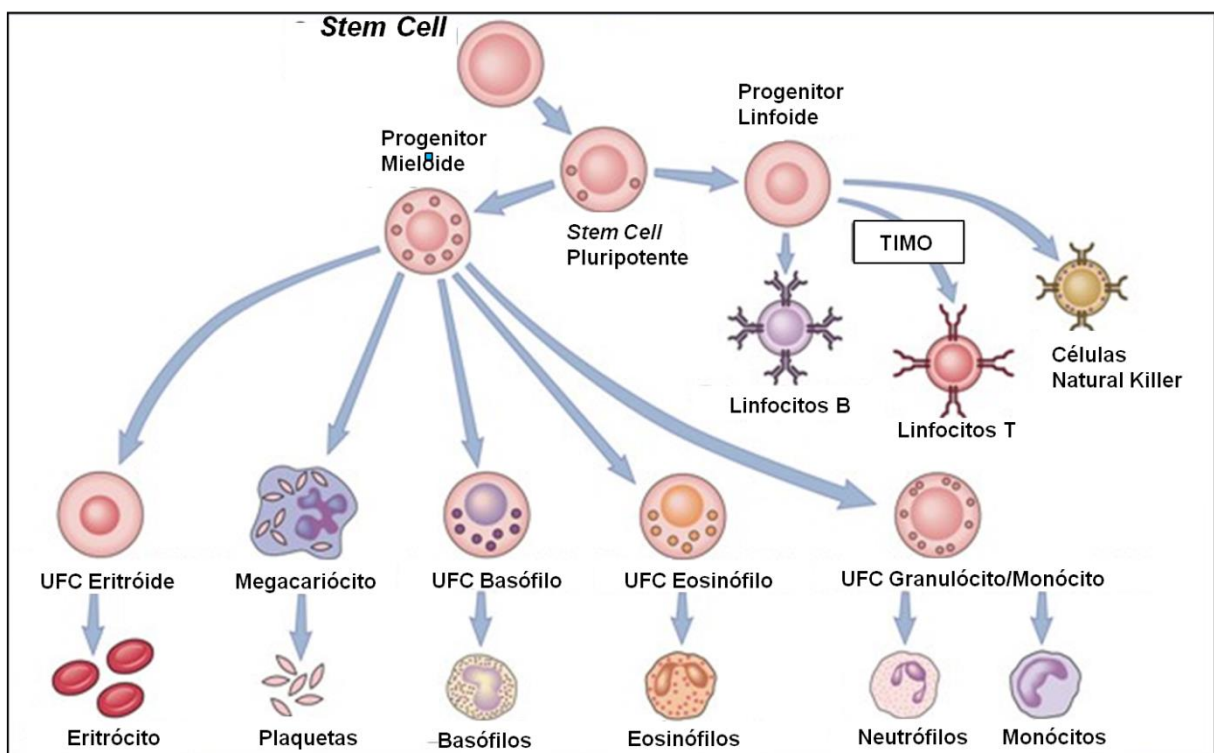
2.1 FUNÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CÉLULA TRONCO HEMATOPOÉTICA

A célula tronco hematopoética (CTH) é encontrada ao longo do corpo e pode ser definida como uma população de células indiferenciadas, pluripotentes capazes de auto-renovação e geração de células progenitoras altamente especializadas (NG; ALEXANDER, 2017). Quando esta célula se divide, ela pode gerar pelo menos uma célula filha com potencial de CTH (auto-renovação). No entanto, existem outras células progenitoras hematopoéticas multipotentes, com a capacidade de gerar células filhas com o mesmo potencial de linhagem e por períodos de tempo limitado, mas somente a CTH pode se autorrenovar por um período suficiente para suportar o sistema hematopoético por toda a vida (SCHROEDER, 2010). A CTH apresenta propriedades proliferativas e diferentes funções, dependendo da sua localização física ou compartimento tecidual. A hematopoese é um processo contínuo de desenvolvimento e diferenciação, no qual a CTH se define numa célula específica e a propriedade multipotente desta célula, permite que uma única célula possa proliferar e se diferenciar em progenitores e precursores mais comprometidos, produzindo todas as linhagens maduras do sangue (eritroide, mieloide e linfoide) (BRYDER; ROSSI; WEISSMAN, 2006; SHIZURU; NEGRIN; WEISSMAN, 2005), como mostra a figura 1. Devido à rápida rotatividade nas células maduras do sangue, somente as CTH, hábeis por definição de auto-renovação e por possuírem propriedades multilinhagem, podem manter a produção contínua das células sanguíneas. As CTHs do adulto são geradas durante o desenvolvimento embrionário (BOISSET; ROBIN, 2012; SCHROEDER, 2010), mantendo, um número apropriado e o tipo de células maduras, constituída de um complexo trabalho regulatório que não é completamente entendido. A diferenciação de células hematopoéticas é regulada pela interação do estroma com citocinas solúveis e citocinas ligadas às células. A

CTH mais primitiva expressa na superfície celular o antígeno CD34 e receptores para fatores hematopoéticos de ativação iniciais: receptor de domínio kinase (KDR), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e reguladores de desenvolvimento hematopoético primitivos como o *c-kit* (*receptor tyrosina kinase*) e *FLT-3* (*receptor tipo tyrosina kinase 3*) (HATZIMICHAEL; TUTHILL, 2010).

A CTH tem muitas propriedades que tornam o transplante mais fácil que os outros tipos de células troncos: é uma célula normal removida diretamente do seu ambiente por uma simples aspiração e ao serem injetadas, fora do seu nicho, na circulação sanguínea, de um receptor, elas sobrevivem, retém seu potencial de célula tronco e encontram seu caminho de volta para seu nicho normal, e resumem sua função na regeneração do sistema hematopoético. Estas células são muito raras e somente uma, em milhares de células, na medula de adulto é a CTH (SCHROEDER, 2010).

Figura 1 — Esquema de desenvolvimento da hematopoese



Fonte: Abbas *et al.*, 2017. (ABBAS *et al.*, 2017)

2.2 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTIICAS

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), inicialmente chamado de transplante de medula óssea (TMO), teve sua origem no início de 1945, com os primeiros estudos realizados em roedores, demonstrando a habilidade da medula óssea (MO) de prevenir a letalidade da irradiação. Barnes *et al.* sugeriram a existência do efeito enxerto versus leucemia (*graft-versus-leukemia-GVL*) no início de 1956, quando notou a erradicação da leucemia em ratos irradiados que receberam transplante de células tronco hematopoéticas alogênico (TCTH-alo), mas não transplante singênico de gêmeos idênticos (BARNES *et al.*, 1956). Outros estudos como os de Gatti *et al.* reportaram o primeiro TCTH-alo em um lactente com imunodeficiência combinada grave (SCID-*Severe combined immunodeficiency*), utilizando células de MO de doadores irmãos HLA compatíveis (GATTI *et al.*, 1968; PORTA; LOCATELLI; BURGIO, 2008). Em 1971, Thomas *et al.* publicaram um dos primeiros trabalhos de transplante de doador irmão HLA-compatível para malignidades hematológicas (APPELBAUM, 2007; THOMAS; BUCKNER; RUDOLPH, 1971). Nos próximos anos, o uso do TCTH-alo foi limitado a síndromes de falência da MO adquirida e congênita, imunodeficiências e leucemia refratária avançada. Em 1977, Thomas *et al.* publicaram seus resultados de TCTH-alo para 100 pacientes consecutivos com leucemia aguda e demonstraram, por primeira vez, que uma pequena porcentagem de pacientes podia ser curada dessa doença letal (THOMAS *et al.*, 1977). Esse estudo também mostrou que pacientes transplantados no estágio inicial da doença tinham melhor prognóstico, que aqueles com estágio mais avançado. O uso do TCTH-alo para doenças hematológicas em 1980 e início de 1990 foi restrito a pacientes jovens (≤ 45 anos) com um HLA idêntico ao do doador. O regime de condicionamento menos intensivo, a melhora na profilaxia da DECH e cuidados suportivos estenderam o uso do TCTH-alo a pacientes mais velhos. Em 1987-1992, somente

4% dos receptores dos transplantes tinham mais de 50 anos. Em 2006, 33% dos receptores do TCTH-alo tinham mais de 50 anos, e 11% mais de 60 anos (HATZIMICHAEL; TUTHILL, 2010). A aplicação TCTH em pacientes não HLA idêntico foi facilitada pela criação de um grande registro de doadores não relacionados. Entre 1987 e 1992, menos que 10% dos TCTH realizados para doenças hematológicas foram de doadores não relacionados, em 2006 mais que 40% (HATZIMICHAEL; TUTHILL, 2010). Em meados de 2014, houve melhora na seleção do doador/receptor, regime de condicionamento, profilaxia de DECH, tratamento e atenção a complicações infecciosas, assim a maioria da mortalidade relacionada ao transplante foi decorrente de recaída da doença primária (HATZIMICHAEL; TUTHILL, 2010).

O número de TCTH continua aumentando, são mais que 25000 TCTH-alo realizados por ano (FERRARA *et al.*, 2009). O TCTH-alo hoje é um tratamento efetivo para muitas doenças hematológicas malignas e não malignas, bem como deficiências imunes, genéticas, desordens metabólicas e outras condições, como mostra a tabela 1 (HARRIS; FERRARA; LEVINE, 2013). A fonte de CTH utilizada para o transplante pode ser a MO, o sangue periférico (SP), ou do sangue de cordão umbilical (SCU). O transplante alogênico pode ser aparentado: onde o doador é relacionado HLA compatível (mais comum entre irmãos); não aparentado: doador não relacionado, em que o doador é HLA compatível, mas não é aparentado com o receptor; singênico: em que o doador é geneticamente idêntico ao receptor (entre gêmeos) e haploidêntico: onde o doador e o receptor têm 50% de compatibilidade compartilhando um haplótipo. A indicação do transplante depende de condições clínicas do paciente, objetivo terapêutico e a disponibilidade e origem da célula progenitora (HATZIMICHAEL; TUTHILL, 2010).

Tabela 1 — Doenças tratadas com TCTH-alogênico**Não neoplásicas**

Anemia Aplásica
 Anemia de Fanconi
 Síndrome Diamond-Blackfan
 Anemia Falciforme
 Talassemia
 Hemoglobinúria Paroxística Noturna
 Síndrome de Chediak-Higashi
 Doença Granulomatosa Crônica
 Trombastenia de Glanzmann
 Osteopetrose
 Desordem de armazenamento lizossomal
 Doença de Gaucher
 Pick-Niemann
 Mucopolissacaridose
 Glicoproteinose
 Imunodeficiências
 Ataxia Telangiectasia
 Síndrome de DiGeorge
 Imunodeficiência Combinada Severa
 Wiskott-Aldrich
 Síndrome Kostmann
 Síndrome Shwachman-Diamond

Neoplásicas

Leucemias
 Leucemia Mieloide Aguda
 Leucemia Linfoide Aguda
 Leucemia Hairy Cell
 Leucemia Linfocítica Crônica
 Mielodisplasia
 Linfomas
 Linfoma de Hodgkin
 Linfoma Não-Hodgkin
 Mieloma Múltiplo
 Mieloproliferações
 Mielofibrose
 Policitemia Vera
 Leucemia Mielóide Crônica
 Tumores Sólidos
 Neuroblastoma
 Tumor desmoplásico de pequenas células redondas
 Sarcoma de Ewing

2.3 HISTÓRIA DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO

Em 1945, no final da segunda guerra mundial, a guerra nuclear que destruiu Hiroshima e Nagasaki, inspirou Dick W van Bekkum, diretor do *Radiobiological Institute of the Dutch Organization for Applied Scientific Research TNO, Rijswijk, The Netherlands*, a estudar a irradiação corporal total (*total-body irradiation-TBI*) em modelos animais. Após altas doses de TBI, camundongos morreram de uma “doença primária” ou aplasia da medula óssea. A administração intravenosa de células da medula óssea alogênicas retardou a mortalidade, mas não a preveniu. Inicialmente foi dito que as mortes tardias foram causadas por uma “doença secundária” (VRIESENDORP; HEIDT, 2016). Em 1960, van Bekkum, junto com uma equipe multidisciplinar definiram as variáveis para o controle do prognóstico do transplante de medula óssea, cujos resultados foram publicados entre 1956 e 1981 (VRIESENDORP; HEIDT, 2016).

Em 1956, Barnes e Loutit reportaram o sucesso de um tratamento de leucemia em camundongos com irradiação supraletal, seguida de infusão de medula óssea de camundongo normal resultando em pega (BARNES *et al.*, 1956). Demonstraram também que, estes camundongos irradiados infundidos com medula alogênica e células do baço, quando recuperados da lesão e aplasia provocadas pela radiação, desenvolviam diarreia, perda de peso, alterações na pele e anormalidades hepáticas e subsequentemente, morriam devido à chamada “doença secundária”. Este fenômeno foi reconhecido pela primeira vez por Barnes e Loutit como Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH). Uma década mais tarde, em 1966, Billingham postulou três requisitos cruciais para o desenvolvimento da DECH (BILLINGHAM, 1966). O primeiro é que o enxerto deve conter um número suficiente de células imunologicamente competentes, as quais hoje são reconhecidas como células T maduras. Segundo, o sistema imunológico do receptor deve ser incapaz de gerar uma resposta

imune eficaz contra o enxerto, pelo menos por um tempo suficiente para que este manifeste a competência imunológica. Essas células imunocompetentes são os linfócitos T, presentes no inóculo da CTH, e são necessários para uma resposta imune efetiva (KERNAN; COLLINS, 2016). Um sistema imune normal é capaz de rejeitar as células T estranhas do doador, porém quando o sistema imune do receptor está comprometido através do uso de vários agentes imunoablativos (quimioterapia e/ou radioterapia), o receptor é incapaz de rejeitar as células transplantadas. Assim, a DECH ocorre, quando as células T do doador demonstram intolerância imunológica a proteínas definidas, geneticamente, nas células (FERRARA *et al.*, 2009). Terceiro, o receptor deve expressar antígenos teciduais que não estão presentes no doador, ou seja, devido à falta de isoantígenos no doador do enxerto ou a diferença de histocompatibilidade entre o doador e o receptor (FERRARA *et al.*, 2009; WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007). Sabe-se que os antígenos teciduais diferentes no doador e receptor são os HLAs de classe I e II e sua expressão, na superfície celular, é crucial para a ativação de células T alogênicas e inicialização da DECH (MARTIN *et al.*, 1990). A probabilidade de DECH é diretamente relacionada ao grau de disparidade entre pacientes e doadores, embora a DECH aguda moderada e severa possa ocorrer em 40% dos pacientes que receberam transplante HLA idênticos (JAGASIA *et al.*, 2012). Estes três postulados formaram o fundamento para todas as hipóteses posteriores relacionadas à patogênese da DECH.

Quase quatro décadas atrás, Korngold e Sprent identificaram células maduras do doador como mediadores celulares fundamentais da DECH em um MHC e antígenos menores de histocompatibilidade (mHAs), compatíveis no TCTH alogênico (KORNGOLD; SPRENT, 1978). Posteriormente, foi estabelecido o papel crítico do hospedeiro (SHLOMCHIK, 1999), do doador (REDDY *et al.*, 2005) e da célula apresentadora de antígeno (CAA) no desenvolvimento da DECH. Sabe-se que a interação fundamental para a indução da DECH e

para toda resposta imune adaptativa, é a interação de células T do doador com a CAA e esta, é regulada positiva ou negativamente por uma grande quantidade de citocinas, quimiocinas e subtipos celulares do sistema imune. Todavia, o mecanismo chave que leva à manutenção e cronicidade do processo de DECH permanece largamente desconhecido. Logo a interação cruzada entre múltiplas células e moléculas inflamatórias leva ao pouco entendimento do mecanismo da DECH aguda (PACZESNY *et al.*, 2010).

2.4 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO

A DECH é uma doença progressiva e sistêmica, caracterizada por imunossupressão e envolvimento de órgãos específicos. Historicamente, a DECH aguda (DECHa) foi definida como uma manifestação de rejeição que acontece, nos primeiros 100 dias após o transplante, enquanto a DECH crônica (DECHc) refere-se a sinais de rejeição existentes após os 100 dias (BILLINGHAM, 1966; FERRARA *et al.*, 2009).

A DECHa afeta 40-60% dos pacientes (JAGASIA *et al.*, 2012) e pode ser fatal em 15-40% dos casos (SUN *et al.*, 2007) de pacientes HLA relacionados submetidos ao TCTH e acima de 50-70% dos pacientes que recebem TCTH de doadores HLA não relacionados. Em casos onde o dano do órgão é avançado ou quando não há resposta a altas doses de terapia com corticoesteróides, a mortalidade pode exceder a 90%. A DECHa ocorre tipicamente dentro de dois meses (JAGASIA *et al.*, 2012) até os 100 dias após o transplante e pode afetar principalmente a pele, intestino e fígado (PASQUINI, 2008). Manifestações de DECHa podem ocorrer mais tardiamente e se sobrepor às manifestações crônicas (FILIPOVICH *et al.*, 2005).

O risco de DECHa é influenciado pela pré-existência de fatores relacionados ao paciente, ao doador, fatores específicos da doença, tipo de tratamento de condicionamento

pré-transplante e regime profilático. Baseado nesses fatores, em 2005, o *National Institute for Health (NIH)* liberou um novo consenso que refinou a definição de DECH, identificando algumas controvérsias entre as duas condições (INAMOTO; JAGASIA, 2014; PAVLETIC; VOGELSANG; LEE, 2015), através do reconhecimento de sinais de DECHa e DECHc fora do período estipulado previamente (FILIPOVICH *et al.*, 2005; JAGASIA *et al.*, 2015). (Tabela 2)

Tabela 2 — Classificação de DECH baseada no consenso NIH 2005

Classificação	Tempo sintomas	Características DECHa	Características DECHc
Aguda			
Clássica	< 100 dias	Presente	Ausente
Persistente/recorrente/tardia	> 100 dias	Presente	Ausente
Crônica			
Clássica	Não tem tempo limite	Ausente	Presente
<i>Overlap</i> Síndrome	Não tem tempo limite	Presente	Presente

Abreviaturas: DECHa: Doença do Enxerto contra o hospedeiro aguda; DECHc: Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica; NHI: *National Institute for Health*.

Fonte: Filipovich *et al.* *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005;11:945-956. (FILIPOVICH *et al.*, 2005)

2.4.1 Patofisiologia da DECH aguda

A patofisiologia da DECHa é compreendida como um processo que consiste de duas fases: fase aferente e eferente. Primeiro, ocorre o reconhecimento das células linfoides T ativadas do doador pelos tecidos do receptor (fase aferente). Subsequentemente, as células linfoides T ativadas atacam diretamente o tecido alvo do receptor transplantado (fase eferente) ou recrutam as células efetoras as quais contribuem para o desenvolvimento do dano tecidual nos órgãos alvos. É evidente a ocorrência de produção inapropriada de citocinas, que são moléculas regulatórias centrais do sistema imune, como causa primária para a indução e progressão de DECH experimental e clínica (ANTIN *et al.*, 2014; KRENGER, 1996). Dentro

destas fases estão as três fases sequenciais, que constituem a patofisiologia da DECH (WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007), que podem ser conceitualizadas para ilustrar a complexa interação celular e a cascata inflamatória, que evolui para DECH aguda: (1) ativação da CAA; (2) ativação das células T do doador, proliferação, diferenciação e migração (fase aferente); e (3) destruição do tecido alvo pelas células efetoras (fase eferente) (REDDY; FERRARA, 2003).

2.4.1.1 Fase aferente

Neste estágio, fatores como o regime de condicionamento, a doença anterior e a presença de comorbidades dos pacientes, podem levar ao dano no tecido do hospedeiro. Assim, endotoxinas bacterianas podem passar do lúmen intestinal para a circulação e induzirem a liberação de citocinas inflamatórias, como a IL-1, TNF-alfa, IL-6 e INF-gama (HILL; FERRARA, 2000; ZEISER *et al.*, 2004), caracterizando a DECH como um processo inflamatório, no qual ocorre uma “tempestade de citocinas” e a presença de polimorfismos nos genes destas proteínas influenciam diretamente nesse cenário. Entretanto, o balanço entre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias na causa da DECH é complexo e provavelmente influenciado por muitas variáveis do transplante.

2.4.1.1.1 Fase 1: Dano tecidual no hospedeiro devido ao regime de condicionamento e ativação das CAA

A primeira fase da DECH é caracterizada pela ativação do sistema imune inato, resultando num estado de inflamação sistêmica. Essa fase ocorre antes da infusão das células do doador, no qual os tecidos do paciente podem ser profundamente danificados, devido à

doença de base, ao tratamento da doença inicial, infecções, drogas e radiação usadas no regime de condicionamento (HILL *et al.*, 1997).

O regime de condicionamento é crucial para erradicar a doença de base e manter o enxerto das células do doador livre de rejeição pelo receptor. É uma variável importante na patogênese da DECHa (HILL; FERRARA, 2000), pois leva ao dano tecidual e ativação dos tecidos do hospedeiro, incluindo a mucosa intestinal, fígado e outros tecidos (XUN *et al.*, 1994). O dano tecidual responde com múltiplas alterações, incluindo a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias como INF-gama, TNF-alfa, IL-6 e IL-1 (HILL *et al.*, 1997; HILL; FERRARA, 2000; XUN *et al.*, 1994). Essas citocinas inflamatórias aumentam a expressão de antígenos do MHC e aumentam as moléculas de adesão na CAA do hospedeiro, que levam a um aumento do reconhecimento pelas células T maduras do doador (HILL; FERRARA, 2000).

Assim, os “sinais de danos” ativam as CAA do hospedeiro (MATZINGER, 2002; NASSEREDDINE *et al.*, 2017; SHLOMCHIK, 1999), que apresentam ao hospedeiro aloantígenos a suas moléculas MHC (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; PACZESNY *et al.*, 2010), e secretam citocinas pró-inflamatórias que levam a ampla ativação das células T presentes no inóculo da CTH (MATZINGER, 2002). O sítio inicial da interação entre CAA e as células T do doador provavelmente é o tecido linfóide secundário no trato gastrointestinal (TGI) (MURAI *et al.*, 2003). Este processo confirma a observação de que o risco aumentado de DECH após o TCTH está associado com o regime de condicionamento que causa extensivo dano a superfícies do epitélio e endotélio e subsequente liberação de citocinas inflamatórias e aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície celular (GALE *et al.*, 1987).

Há diferentes subtipos de CAAs do hospedeiro e do doador (REDDY *et al.*, 2005; SHLOMCHIK, 1999; TESHIMA *et al.*, 2002), como as células dendríticas (DUFFNER *et al.*,

2004), células de Langerhans (MERAD *et al.*, 2004), células B, e monócitos/macrófagos (HILL *et al.*, 1997; HILL; FERRARA, 2000; NACHBAUR *et al.*, 2003). Contudo, a contribuição relativa destes vários tipos celulares deve ser esclarecida.

Os danos teciduais causados pelo regime de condicionamento liberam na circulação os gatilhos não genéticos DAMPs (são moléculas de padrão molecular associado a danos), resultantes de moléculas não infecciosas, incluindo componentes da matriz extracelular como adenosina-5'-trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), ácido úrico, heparan sulfato proteoglicano (HSPG), proteína de alta mobilidade grupo box-1 (HMGB1), proteínas de choque térmico, proteína de matriz extracelular (ECM) (MAGENAU; RUNAAS; REDDY, 2016; TOUBAI *et al.*, 2016) e PAMPs (padrão molecular associado a patógenos), tais como lipopolissacarídeos (LPS), também chamados de endotoxinas, que são parte da membrana celular de bactérias gram-negativas (TOUBAI *et al.*, 2016). Essas moléculas infecciosas são perigosas e resultam em uma perpétua e exagerada resposta inflamatória (NASSEREDDINE *et al.*, 2017). Ocorrem danos na barreira do trato gastrointestinal (TGI), que permitem a troca sistêmica dos LPS (TOUBAI *et al.*, 2016) e produtos microbianos imunostimulatórios, como a liberação de bactérias, que alteram a microbiota do intestino e consequentemente desencadeiam a propagação da resposta imune.

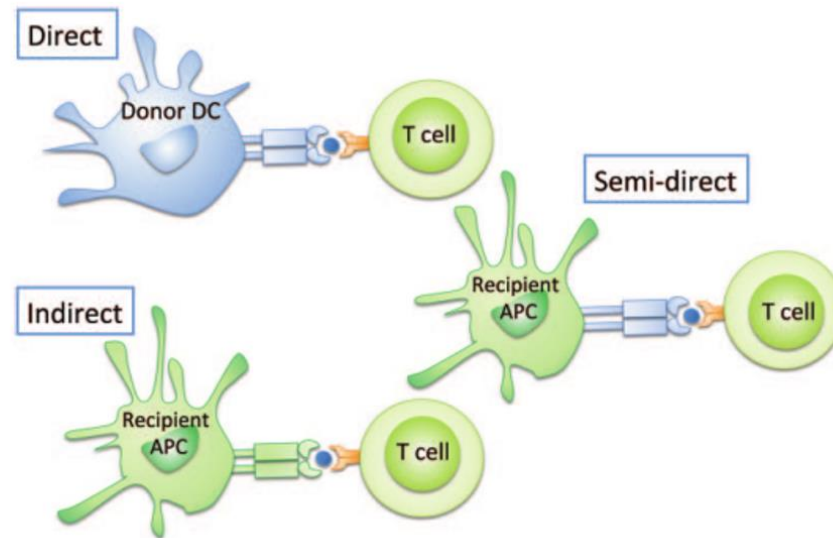
2.4.1.1.2 Fase 2: Ativação das células T do doador (Indução e fase de expansão)

A segunda etapa é caracterizada pela ativação das células T do doador, proliferação e diferenciação como resposta a apresentação de antígenos pelas CAA do hospedeiro em um contexto pró-inflamatório. O processo requer a interação das células T do doador com a CAA, que promove a ativação, proliferação, diferenciação e migração das células T (SACKSTEIN, 2006; WYSOCKI *et al.*, 2005).

A ativação das células T requer dois sinais: o primeiro sinal é gerado pela interação com o receptor de células T (TCR-*T cell receptor*) (SAKIHAMA; SMOLYAR; REINHERZ, 1995) e o segundo, é chamado coestimulatório, que requer um contato direto com a CAA (YANG; WILSON, 1996). Este sinal determina o resultado da sequência de ativação, levando à ativação completa, parcial ou estado de longa duração de antígenos específicos ou a falta de resposta, denominado anergia. Os TCRs reconhecem alo antígenos nas CAAs do hospedeiro e do doador, presentes nos órgãos linfoides secundários (BEILHACK *et al.*, 2005). Durante a apresentação de antígeno, o reconhecimento de células T ocorre pelo complexo MHC/peptídeo via TCR antígeno-específico, ou seja, as células T do doador reconhecem o peptídeo ligado às moléculas MHC do hospedeiro, ou as moléculas estranhas MHC de si próprio (WEIJTENS *et al.*, 2002). A seguir do reconhecimento do antígeno, através da sinalização do TCR ocorre a indução da alteração conformacional, nas moléculas de adesão, resultando em ligação de alta afinidade à CAA (COBBOLD; MARTIN; WALDMANN, 1986). O complexo de interação entre moléculas co-estimulatórias e seus ligantes nas CAAs facilita toda a ativação de células T. Um grande número de moléculas co-estimulatórias de células T mostram funções únicas e sobrepostas (SUN *et al.*, 2007).

O transplante é a única situação imunológica na qual o reconhecimento do antígeno pelas células T do receptor pode ocorrer por três diferentes caminhos (figura 2): alo-reconhecimento direto: é a interação das células T do receptor pelo TCR com o complexo de peptídeos MHC alogênicos intactos apresentados pelas CAA derivadas do doador, incluindo células dendríticas. Indireto: o alo-reconhecimento ocorre quando peptídeos derivados do MHC do doador ou mHA são degradados por vias de processamento de antígeno e apresentado pelas CAA do receptor. Semidireto: o alo-reconhecimento é a captura do complexo peptídeo-MHC do doador pelas CAA do hospedeiro (WOOD; GOTO, 2012).

Figura 2 — Reconhecimento de aloantígenos pela célula T



Reconhecimento direto: alorreconhecimento é a interação das células T do receptor através do TCR com aloantígenos intactos do MHC-peptídeos apresentados pela CAA derivadas do doador. Reconhecimento indireto: o alo-reconhecimento ocorre quando peptídeos derivados do MHC do doador ou mHAs são degradados pela via de processamento de antígeno e apresentados pela CAA do receptor. Reconhecimento semidireto: o alo-reconhecimento é a captura do complexo peptídeo-MHC do doador pelas CAA do receptor.

Fonte: Wood K & Goto R. Transplantation 2012; 93:1-10. (WOOD; GOTO, 2012)

2.4.1.1.3 Coestimulação

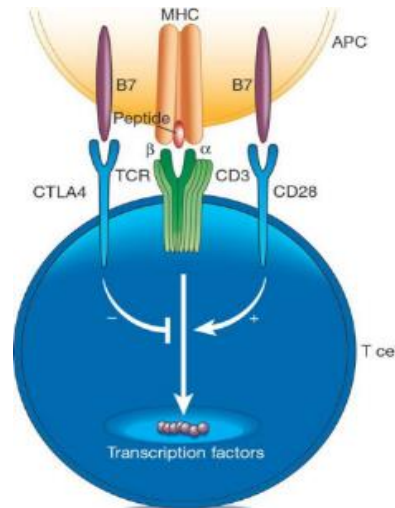
Somente a interação entre o TCR dos linfócitos do doador com os alo-peptídeos do hospedeiro presente no MHC da CAA é insuficiente para induzir a ativação das células T (APPLEMAN; BOUSSIOTIS, 2003). Assim, é preciso o segundo sinal chamado “coestímulo” (figura 3). As moléculas coestimulatórias mais significantes, indispensáveis para o estímulo da célula T, são o CD28, ICOS, CD40L (CD154), CD30, 4-1BB (CD137) e OX40 (BRIONES; NOVELLI; SIERRA, 2011). Ao contrário, o CTLA-4 ou PD-1 são necessários para a eliminação fisiológica de linfócitos T aloreativos e apresentam efeitos inibitórios da ativação das células T (BRIONES; NOVELLI; SIERRA, 2011; MUELLER, 2010). O CD28 é um receptor expresso nas células T (CD4+ e CD8+) e células NK. A ligação do CD28 após a sinalização do TCR aumenta a proliferação de células T e secreção de citocinas. Essa

molécula se une a dois ligantes, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) que são expressos na CAA, principalmente células B e células dendríticas (LENSCHOW; WALUNAS; JEFFREY, 1996), que se ligam a um antígeno adicional de célula T. A interação CD28/B7 confere um sinal de ativação, enquanto a interação CTLA-4:B7 confere um sinal negativo que inibe a proliferação de células T. Outros membros da família CD28 inclui o ICOS e PD-1 (morte programada 1). O ICOS está presente nas células T ativadas e de memória, liga-se ao ligante B7, e promove a resposta efetora (DONG *et al.*, 2001; NURIEVA *et al.*, 2003). O PD-1 (CD279) é um inibidor das células T ativadas. É expresso no citoplasma de células T regulatórias (RAIMONDI *et al.*, 2006). O bloqueio ou ausência do PD-1, nas células do doador, acelera a DECH mediada por células CD4+ e CD8+ e está associado com aumento da produção do INF-gama (BLAZAR *et al.*, 2003). OX40 (CD134) é um membro da superfamília do receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNFR) e está presente nas células T CD4 + e CD8+ ativadas, e seu ligante OX40L, está presente nas CAA. O CD40 também é um membro da família do TNFR, expresso na CAA (células B, dendríticas e monócitos), e seu ligante o CD40L (CD154) é expresso nas células T CD4+ ativadas e pequenos subtipos de células T CD8+. A ligação estimula a expressão de moléculas co-estimulatórias na CAA (ex: CD80, CD86) e contribui para a efetiva ativação das células T. A interação CD40:CD40L aumenta a secreção de citocinas pro-inflamatórias (IL-2, IL-12 e INF-gama) que contribui para ativação das células T e células NK e resulta na letalidade da DECHa (WEKERLE *et al.*, 1998). A ligação do TCR e o coestímulo via o “segundo” sinal são necessários para realizar a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células T (SHARPE; FREEMAN, 2002).

Uma vez ativadas, estas células T aloreativas podem proliferar e migrar na resposta a um ambiente inflamatório (CHAKRAVERTY *et al.*, 2006) e causar a ativação de receptores de quimiocinas, incluindo CCR2 (TERWEY *et al.*, 2005), CCR5 (MURAI *et al.*, 1999), CCR6 (VARONA *et al.*, 2005) e CCR7 (YAKOUB-AGHA *et al.*, 2006) entre outros. CCR7 é

expressa em subtipos de células T bem como nas CAA, sendo importante na migração de células T *naive*, células T de memória central e células dendríticas nos tecidos linfoides. Seus ligantes são CCL21 e CCL19 (WENINGER; VON ANDRIAN, 2003). CD30/CD30L (CD153) são membros da família de ligantes TNFR/TNF respectivamente. O CD30 é expresso nas células T ativadas, e entre muitas consequências desta ligação é a inibição do CCR7 (MUTA *et al.*, 2000). As vias co-estimulatórias enviam sinais positivos e negativos, e moléculas das duas maiores famílias, a família B7 e o receptor TNF (TNFR), têm um papel importante na DECH (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). Adicionalmente as células T do receptor, assessoram moléculas tais como CD4, CD8, LFA-1, LFA-2 e CD44, participantes da interação célula-célula pelo aumento do contato celular e comunicação.

Figura 3 — Duplo sinal da ligação entre células linfoides T e CAA



Fonte: Appelbaum FR. Nature 2001;411:4:385-389. (APPELBAUM, 2001)

A composição do aloantígeno do hospedeiro determina qual subtipo de célula T vai proliferar e se diferenciar. Quando a célula T CD4⁺ entra na corrente sanguínea do receptor, ela interage com moléculas MHC classe II das CAA, enquanto as células linfoides T CD8⁺

interagem com antígenos MHC classe I, sendo estimuladas por estas. As proteínas CD4 e CD8 são co-receptores para as porções constantes das moléculas do MHC classe II e classe I, respectivamente. Na maioria dos TCTH HLA idênticos, a DECH pode ser induzida por um ou outro tipo celular ou pelos dois simultaneamente (FERRARA *et al.*, 1996). Atualmente acredita-se que as células T CD8 do doador são ativadas, predominantemente, pelas CAA hematopoéticas do receptor, enquanto as células T CD4 do doador podem ser ativadas pelas CAA não hematopoéticas do receptor dentro do trato GI (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; KOYAMA *et al.*, 2012; TOUBAI *et al.*, 2012a). Vários caminhos bioquímicos intracelulares são rapidamente amplificados, seguindo a ativação de células T.

2.4.1.1.4 Citocinas e diferenciação das células T

A ativação das células T é associada com a secreção excessiva de citocinas. As subpopulações de células T são importantes na regulação da aloreatividade. Células T Regs e NKs inibem a aloreatividade das células T e diminuem a ocorrência de DECH. Baseada nos diferentes perfis de citocinas os linfócitos T CD4⁺ são subdivididas em subpopulações Th1, Th2 e Th17. Linfócitos Th1 estão envolvidos na patogênese da DECH através da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como INF-gama, IL-2 e TNF-alfa. Entretanto o papel atual das citocinas Th1 na patogênese da DECH não está bem claro, pois essas citocinas exibem várias funções em diferentes órgãos alvos da DECH (BURMAN *et al.*, 2007; PACZESNY *et al.*, 2010). Ao contrário, os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13 e IL-18 que parecem ser protetores contra o desenvolvimento da DECH. Os linfócitos Th17 secretam IL-17, IL-21 e IL22, estes representam uma subpopulação altamente pró-inflamatória capaz de induzir a DECH (GARTLAN *et al.*, 2015). T-bet (*Tbx21*) é o fator de transcrição mais crítico para gerar as células Th1, enquanto o GATA3 tem um importante papel para a diferenciação

de células Th2. Porém diferentes estudos sugerem que as citocinas têm maior importância na indução de fatores de transcrição que determinam a diferenciação das células T (GROGAN *et al.*, 2001; MULLEN *et al.*, 2001). Células Th1 são desencadeadas pela IL-12 e INF-gama, e células Th2 pela IL-4 (FU; HEINRICHS; YU, 2014).

A liberação de IL-2 e INF-gama pelas células Th1 estimula a função efetora inflamatória dos fagócitos mononucleares, enquanto que a liberação de IL-4 e IL-10, pelas células Th2 inibem essa função. Ambos os subtipos de células T CD4+ e CD8+ podem se diferenciar em células Th1 e Th2 (MOSMANN, 1989; SALGAME *et al.*, 1991; SWAIN *et al.*, 1991). A perda do balanço entre subpopulações dos linfócitos T CD4+ pode influenciar a severidade de DECH (BURMAN *et al.*, 2007; FERRARA, 2006; HENDEN; HILL, 2015; JAGASIA *et al.*, 2012; VAN DER WAART *et al.*, 2014; VARELIAS *et al.*, 2015; YI *et al.*, 2009).

Finalmente, as células T regulatórias são um subtipo de células T especializadas na expressão de fatores de transcrição FOXP3 e alta expressão do receptor de IL-2 (CD25). Estas células têm um importante papel regulatório, pela supressão da resposta imune, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF-beta e IL-35 (CORTHAY, 2009) e por meio da interação direta com outros subtipos de células T. As células T Regs são suprimidas durante a DECH, e a restauração da função destas células, pode diminuir a presença da doença (BERES; DROBYSKI, 2013).

Múltiplas citocinas são importantes na patogênese e regulação da DECH. Além disso, o tempo e duração da expressão de citocinas podem ser um fator crítico, determinando a indução da reação enxerto versus leucemia, e a desregulação de citocinas, pode contribuir potencialmente para a severidade de DECH aguda (REDDY; FERRARA, 2003). O TNF-alfa além de indutor da ativação das CAA na fase I estimula a ativação e a proliferação das células T, nesta segunda fase de DECH aguda. A IL-2 controla e amplifica a resposta imune

alogenica, através da ativação de respostas celulares de células T e NK, preparação de macrófagos para liberação de TNF-alfa, além de causar dano inflamatório na pele e no intestino (BALL; EGELER, 2008). A produção de IL-2 também é integral no desenvolvimento inicial de DECH aguda (ROLINK; GLEICHMANN, 1983), e permanece o alvo principal em muitas descobertas clínicas terapêuticas e profiláticas atuais como tratamento com ciclosporina, tacrolimus e anticorpos monoclonais contra IL-2 e seu receptor (ZEISER *et al.*, 2006). O INF-gama é uma citocina com diversos efeitos *in vivo* que pode amplificar e suprimir a DECH aguda (WANG; YANG, 2014). Com respeito à amplificação, o INF-gama aumenta a expressão de moléculas, tais como, receptores de quimiocinas, proteínas do MHC, e moléculas de adesão. Isso resulta na potencialidade da apresentação do antígeno e recruta células efectoras para os órgãos alvos (DUFOUR *et al.*, 2002; MOHAN *et al.*, 2002). Também sensibiliza monócitos e macrófagos a estimular os LPS, acelerando assim, a cascata na resposta para este estímulo (FERRARA, 2006). O INF-gama pode também amplificar DECH por dano direto nas células alvos do TGI e na pele, enquanto por outro lado, induz a imunossupressão mediada por óxido nítrico (ON) (KRENGER W, 1996b) e estimula macrófagos a produzir citocinas pró-inflamatórias e ON em resposta a LPS (NESTEL *et al.*, 1992). O INF-gama sozinho pode prevenir DECH aguda pela apoptose das células T ativadas do doador (YANG *et al.*, 1998). Portanto, esta complexidade torna um alvo desafiante de pesquisa na compreensão de eventuais intervenções terapêuticas (CHOI; LEVINE, 2010).

2.4.1.2 Fase eferente

2.4.1.2.1 Fase 3: Fase efetora inflamatória e celular

A fase eferente, que compreende o terceiro passo da patofisiologia da DECHa, é complexa e provavelmente a menos entendida. Esta fase é caracterizada pela ação local das

células T CD8+ citotóxicas do doador, desencadeada pela liberação de citocinas, durante as duas primeiras fases: estas células mediam o efeito citotóxico direto na célula alvo do hospedeiro, incluindo a secreção de perforina/granzima (WASEM *et al.*, 2001) e através da interação do complexo Fas-FasL (SCHMALTZ *et al.*, 2001). Uma cascata bastante complexa de múltiplos mediadores inflamatórios e celulares ocorre, durante esta fase da DECH aguda, levando ao escalonamento da fase inflamatória. Estes mediadores sinergizam para amplificar o local de lesão tecidual e promovem posteriormente dano ao tecido alvo. Assim, esta fase começa quando as células T efetoras citolíticas do doador causam dano aos órgãos alvos (MORRIS *et al.*, 2013). Os linfócitos T citotóxicos causam a maioria dos danos teciduais e necrose (GHAYUR *et al.*, 1987), mas outras células efetoras, também estão envolvidas neste processo, contribuindo com o dano patológico, como neutrófilos, células NK, células T NK, linfócitos grandes granulares (LGG) e monócitos/macrófagos (TANAKA *et al.*, 2012). Os LGG não reconhecem proteínas do MHC como alvo, mas são provavelmente recrutados por citocinas liberadas pelas células T. A relação precisa entre citocinas induzidas, durante a fase dois e o mediador de dano tecidual, durante a fase três é uma área de investigação ativa. Assim sendo, a fase efetora da DECH envolve aspectos da resposta imune inata e adaptativa, bem como interações com células e citocinas pró-inflamatórias geradas durante fase um e dois.

2.4.1.2.2 Efetores inflamatórios

Citocinas inflamatórias sinergizam com linfócitos T citotóxicos, resultando na amplificação da lesão tecidual local e promoção da inflamação, levando à destruição do tecido alvo no receptor do transplante (ANTIN *et al.*, 2014). Os macrófagos ao se depararem com as citocinas Th1, durante a fase dois, recebem um segundo sinal de evento desencadeante para aumentar a secreção das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-1 (FERRARA, 2009). O TNF-

alfa é uma citocina inflamatória, que causa uma variedade de efeitos biológicos, incluindo o dano tecidual direto pela indução de necrose das células alvo, ou pode induzir a destruição tecidual durante a DECH através da apoptose ou morte celular programada. A apoptose é uma característica da DECH no intestino grosso (SUZUKI *et al.*, 1994), pele (GILLIAM *et al.*, 1996; LANGLEY *et al.*, 1996) e células endoteliais (LINDNER *et al.*, 1997), após o TCTH alogênico. O TNF-alfa também pode causar caquexia, induzir a maturação de células dendríticas, aumentando a apresentação de aloantígenos; através da indução de citocinas inflamatórias que recruta aos órgãos alvos, as células T efetoras, neutrófilos e monócitos (SUN *et al.*, 2007). A IL-1 é a segunda maior citocina pró-inflamatória que parece ter um importante papel na fase efetora de DECH aguda, nos dois maiores órgãos alvos, baço e pele (ANTIN *et al.*, 2014), compartilhando de uma variedade de atividades biológicas com o TNF-alfa (DINARELLO, 1991).

O estímulo à lesão tecidual também pode ser gerado pelos LPS, que extravasaram através do dano da mucosa intestinal pelo regime de condicionamento. O TGI tem um papel crítico na amplificação da DECH aguda, pois o dano da mucosa intestinal na fase um e pelos efetores citolíticos ativados, na fase dois, permitem a migração de LPS do lúmen intestinal para dentro da circulação. Esse dano do TGI, na fase três, aumenta a liberação de LPS, estimulando a produção de citocinas causando dano adicional ao TGI. Assim, o TGI é crítico na propagação da “tempestade de citocinas”, que é característica da DECH aguda (FERRARA, 2000). Os LPS que alcançam os tecidos da pele e outros estímulos inatos, também podem estimular os linfócitos associados ao intestino, queratinócitos, fibroblastos dérmicos, e macrófagos para produzir efetores pró-inflamatórios que tem um papel direto na causa do dano no órgão alvo (LUGER; SCHWARZ, 1990; SUN *et al.*, 2007).

Como resultado da ativação durante a DECH, junto com as citocinas inflamatórias, os macrófagos produzem ON, que contribui para o efeito deletério nos órgãos alvos e na

imunossupressão (FALZARANO *et al.*, 1996; KRENGER; FALZARANO, 1996a, 1996b; LANGREHR *et al.*, 1992). O ON inibe o mecanismo de reparo da destruição do tecido alvo pela inibição da proliferação da *stem cell* epitelial no intestino e na pele (NESTEL *et al.*, 2000). O desenvolvimento de DECH é precedido por um aumento dos níveis no soro de produtos de oxidação do ON (BOGDAN, 2001; LANGREHR *et al.*, 1992). Esse mecanismo pode amplificar o dano tecidual local causado pelos linfócitos T CD8 citotóxicos e pelas células NK, levando à destruição tecidual alvo do hospedeiro, resultando na amplificação da lesão e a promoção da resposta inflamatória.

Também foi avaliado o papel do INF-gama e dos LPS no desenvolvimento de injúria pulmonar aguda após o transplante. A síndrome de pneumonia idiopática é uma pneumonia não infecciosa que constitui aproximadamente 50% de todo comprometimento pulmonar após o TCTH-alo (CLARK *et al.*, 1993). Pacientes com altos níveis de TNF-alfa no soro, durante o regime de condicionamento, têm uma incidência maior de 90% de DECH aguda e uma sobrevida global menor que 30% (HERVE *et al.*, 1992).

2.4.1.2.3 Efetores celulares

Embora as citocinas tenham um importante papel na morbidade e mortalidade da DECH sistêmica, elas podem ser menos importantes como mediadores de dano em órgãos alvos individuais. A presença de DECH na pele, intestino e fígado não é explicada adequadamente pela liberação sistêmica de citocinas e sim, pela citotoxicidade mediada por células, parecendo contribuir para a destruição de tecidos alvos na DECHa. Além disso, a ausência de toxicidade de DECH em outros órgãos viscerais, tais como rins, argumenta contra citocinas circulantes como única causa de dano a tecidos específicos (FERRARA, 2000).

As células T podem ter efeito de citólise por contato direto ou pela liberação de mediadores solúveis como o TNF-alfa. A citotoxicidade dependente do contato das células, através de um caminho secretório que envolve a liberação de grânulos ou pela interação de ligação de membrana celular da célula efetora com receptores da membrana da célula alvo que causa a morte celular (KAGI *et al.*, 1994; LOWIN *et al.*, 1994). As células T citotóxicas são um dos maiores efetores celulares da DECH aguda e lisam as células alvos, usando principalmente as moléculas citolíticas como o ligante Fas/Fas (FasL), enzimas granzima/perforina (grânulos de exocitose), e TNFR-*like* DRs, tais como o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL: DR4, ligante 5) e indutores fracos de apoptose tipo TNF (TWEAK: ligante DR3) (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; JIANG; HERRERA; LECHLER, 2004; KAGI *et al.*, 1994; LOWIN *et al.*, 1994; MAEDA *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 1997a, 1997b; VAN DEN BRINK; BURAKOFF, 2002). A trajetória Fas/FasL parece predominar na DECH hepática enquanto a granzima/perforina são mais importantes no TGI e pele (WELNIAK; BLAZAR; MURPHY, 2007).

O receptor Fas (CD95) pode ser encontrado na superfície de diversos tecidos e sua expressão pode ser regulada por citocinas pró-inflamatórias como INF-gama ou TNF-alfa. O ligante Fas (Fas/L ou CD178) pode ser encontrado em linfócitos T ativados, neutrófilos e macrófagos. A interação entre FasL e o receptor Fas (Fas/FasL), na superfície da célula alvo, criam um complexo indutor de morte celular que ativa uma cascata de caspases, resultando em apoptose celular (KRAMMER, 2000). Em sequência pode-se citar a perforina e a granzima, moléculas presentes nos linfócitos T citotóxicos e células NKs, que permanecem armazenados em grânulos citotóxicos no citoplasma celular. Quando as células reconhecem um alvo, os grânulos rompem-se na superfície celular, e seu conteúdo é liberado. Após a secreção de grânulos pelas células efectoras, as perforinas inserem-se na membrana celular da célula alvo e formam polímeros em forma de canais, podendo gerar lise osmótica da célula, e

ainda, permitir a entrada do conteúdo de grânulos, incluindo granzimas A e B, desencadeando apoptose da célula alvo, rapidamente, induzida pela ativação da granzima B da cascata caspase ou através de diversas vias (KAGI *et al.*, 1994; LOWIN *et al.*, 1994).

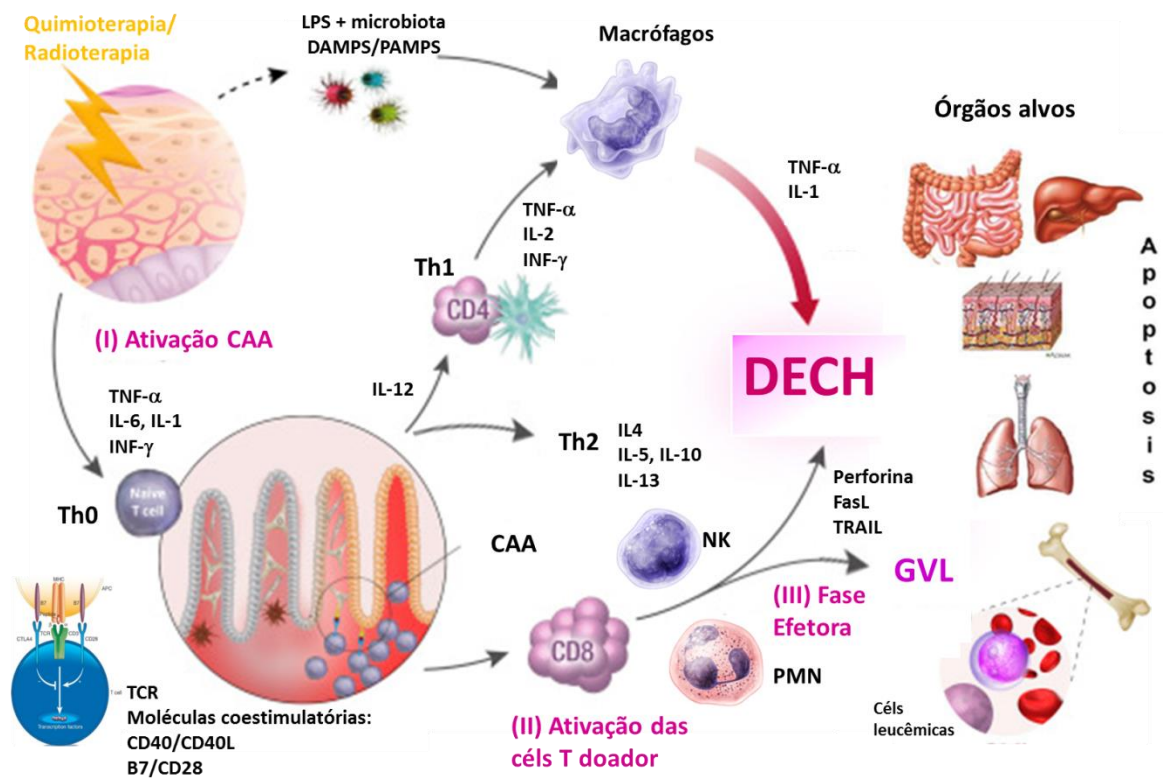
Um caminho comum parece operar na sinalização através dos chamados receptores de morte. Esses são ligantes celulares de indução a apoptose. Moléculas adicionais, incluindo TWEAK e TRAIL, foram recentemente identificadas como capazes de ativação do sistema caspases e levar subsequentemente a apoptose (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; CHINNAIYAN *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1997a; SHERIDAN *et al.*, 1997). As células T CD4+ preferencialmente utilizam o caminho Fas/FasL durante a DECHa, enquanto as células T CD8+ primariamente usam o caminho perforina/granzima, consistente com outras condições envolvendo citólise mediada por células (FERRARA, 2006).

Estudos foram realizados para examinar as consequências no transplante com doadores, cujas células T são deficientes de perforina e com falhas para indução da sinalização Fas, e mostraram que as células mantêm a capacidade de indução de perda de peso e letalidade na DECH (BAKER *et al.*, 1996). Já, a citotoxicidade mediada FasL pode ser um importante efetor no caminho da DECH hepática. Primeiro ocorre uma diminuição de DECH hepática após o transplante de células T defeituosas de FasL e medula normal. Na ausência de citotoxicidade dependente de FasL mediadas pelo doador, uma inflamação renal mínima foi observada em dois modelos de TCTH com mHA desiguais (BAKER *et al.*, 1996). Concordante com estes achados, um estudo relatou que a administração de anti-FasL bloqueou, significativamente, a DECH hepática (HATTORI *et al.*, 1998).

Devido à quimiotaxia, neutrófilos também migram para o sítio do dano tecidual (HOLTAN; PASQUINI; WEISDORF, 2014) e macrófagos ativados também juntam-se aos linfócitos T e apresentam atividade lítica contribuindo para a patogênese da DECH (HOLTAN; PASQUINI; WEISDORF, 2014).

A fisiopatologia da DECH com todas as etapas envolvidas na fase aferente e eferente está representada na figura 4.

Figura 4 — Patofisiologia da DECH aguda



Fases DECH: 1) ativação das células apresentadora de antígeno do hospedeiro; 2) ativação das células T do doador e 3) efetores celulares e inflamatórios.

Fonte: Ferrara *et al.* *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999;5:347-356. (FERRARA; LEVY; CHAO, 1999)

2.4.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas dependem do grau de incompatibilidade HLA doador/receptor e do grau de aloreatividade aos principais antígenos do hospedeiro. Os três principais órgãos primários afetados no processo da DECHa são a pele, fígado e TGI (BALL; EGELER, 2008). Outros sítios, como olhos e mucosa oral, também podem ser afetados (BALL; EGELER, 2008). A pele e o intestino têm a função de barreira e o sistema retículo

endotelial bem desenvolvido. O fígado é a primeira linha de defesa junto com o intestino. Todos estes órgãos são ricos em células dendríticas, um provável pré-requisito para a apresentação de antígeno e a geração de citocinas prejudiciais. Eles são sujeitos a lesão do regime de condicionamento, e violações na barreira devem permitir que organismos e endotoxinas entrem na circulação (FERRARA, 2006). Os pacientes apresentam frequentemente *rash* cutâneo, diarreia, bilirrubina elevada e infecções recorrentes (NASSEREDDINE *et al.*, 2017). Martin *et al.* relata que 81% dos pacientes apresentam DECH aguda na pele, 54% tem envolvimento no TGI e 50% no fígado (MARTIN *et al.*, 1990). O risco de mortalidade varia dependendo do estágio e grau de DECHa (NASSEREDDINE *et al.*, 2017).

2.4.2.1 Lesões de pele

A pele geralmente é o primeiro órgão e o mais afetado (MARTIN *et al.*, 1990). Frequentemente coincide com a infusão das células do doador. A erupção cutânea apresenta características macropapulares, algumas vezes pruriginosas ou dolorosas. Quanto à distribuição é tipicamente, nas palmas das mãos e plantas dos pés, que mais tarde progride para a face, pescoço, parte superior do tronco e tórax (FERRARA *et al.*, 2009). Formas leves podem parecer queimaduras e lesões mais graves apresentando bolhas e ulcerações (BALL; EGELER, 2008; VOGELSANG; LEE; BENSON-KENNEDY, 2003). A presença de bolhas e necroses epidérmicas tóxicas, nos casos mais extremos, assemelha-se a síndrome de *Stevens-Johnson* (DARMSTADT *et al.*, 1992). Outras características incluem disqueratose, exocitose dos linfócitos, satelitismo linfocitário adjacente a queratinócitos epidérmicos disqueratótico, e infiltração linfocitária perivascular na derme (GOKER; HAZNEDAROGLU; CHAO, 2001).

2.4.2.2 Trato gastro-intestinal

O envolvimento do TGI geralmente apresenta-se como diarreia, mas pode incluir náuseas, vômitos, anorexia e dor abdominal. Este é um processo pan-intestinal com lesão focal de intensidade variável. O envolvimento gástrico dá origem a vômitos pós-prandiais que nem sempre são precedidos por náuseas. Na doença avançada pode apresentar distensão abdominal, com dor difusa e severa, acompanhada por diarreia volumosa. As características histológicas incluem ulcerações irregulares, corpos apoptóticos na base das criptas, abscessos da cripta, e perda, bem como achatamento da superfície do epitélio. A severidade é determinada pelo volume de diarreia, que é secretória e frequentemente volumosa (mais de dois litros por dia) (SNOVER *et al.*, 1985). Progressão com dor abdominal hemorragia e íleo está associada com fases posteriores da DECH (BALL; EGELER, 2008). A presença de hemorragia apresenta pior prognóstico e ocorre como resultado de ulcerações da mucosa (PONEC; HACKMAN; MCDONALD, 1999).

2.4.2.3 Fígado

As características iniciais incluem o desenvolvimento de icterícia, dano do canalículo biliar, levando à colelitíase com hiperbilirrubinemia e fosfatase alcalina elevada. A severidade é baseada nos níveis de bilirrubina no soro (SNOVER *et al.*, 1984) e hepatomegalia. Entretanto, às vezes é difícil de distinguir de outras causas de disfunção hepática, que acompanham o transplante, tais como doença veno-oclusiva (DVO), toxicidade a drogas, infecções oportunistas (bacteriana, viral e fúngica), colecistite acalculosa, sepse ou sobrecarga de ferro, devido ao padrão de sobreposição da história clínica, exame físico, exames de imagens e laboratoriais. Portanto, a biópsia é frequentemente necessária para confirmar o diagnóstico de DECH hepática (CHOI *et al.*, 2005). Achados histológicos são endotelialite,

infiltração linfocítica da área portal, pericolangite e destruição do ducto biliar. Porém, o risco aumentado de hemorragia associada com trombocitopenia, no período pós-transplante, imediato, pode impedir a obtenção de uma biópsia. Assim sendo, o diagnóstico de DECH hepática é frequentemente um diagnóstico clínico de exclusão (CHOI; LEVINE, 2010).

2.4.2.4 Sistema hematopoético

O sistema hematopoético também é afetado com atrofia tímica, citopenias (trombocitopenias), e hipogamaglobulinemia (IgA).

2.4.2.5 Outros órgãos

Outros órgãos como olhos (fotofobia, conjuntivite hemorrágica, lagofthalmos), mucosas e rins (nefrite, síndrome nefrótica) são raramente afetados.

2.4.3 Estágios e graus de DECH

O sistema de classificação da DECH aguda foi proposto por Glucksberg *et al.* em 1974 (GLUCKSBERG *et al.*, 1974), e revisado por Thomas *et al.* em 1975 (THOMAS *et al.*, 1975). Este sistema avalia o nível de gravidade dependendo da extensão e envolvimento dos três principais órgãos alvos: pele, fígado, TGI (Tabela 3). O grau é classificado como I (DECH leve), II (moderada), III (severa) e IV (muito severa) (Tabela 4) com base no padrão e na gravidade do envolvimento de órgãos e na avaliação subjetiva do desempenho clínico (HARRIS *et al.*, 2016; REDDY; FERRARA, 2018; ROWLINGS *et al.*, 1997). A DECH severa pode estar associada com pior prognóstico, com 25% de sobrevida para pacientes com grau III e 5% dos pacientes com grau IV (CAHN *et al.*, 2005).

O sistema de classificação Glucksberg é amplamente utilizado e é uma ferramenta valiosa para estudar a ocorrência e o manejo da DECH aguda e seu efeito sobre o resultado do transplante. No entanto, ele foi desenvolvido usando dados de apenas 61 pacientes em uma época de poucos recursos terapêuticos para a prevenção de DECH (ROWLINGS *et al.*, 1997).

Posteriormente foi construído um Índice de severidade pelo IBMTR, classificando a DECH aguda, de A a D, com base apenas no envolvimento de órgãos, agrupando pacientes com riscos semelhantes de desfecho (Tabela 5). A reclassificação foi fundamentada em resultados baseados em padrões de envolvimento de órgão individuais para tornar este índice de severidade mais sensível e específico para o estudo da DECH aguda pós-transplantes alogênicos (ROWLINGS *et al.*, 1997).

Tabela 3 — Estágios de DECH

Estágio	Pele	Fígado (bilirrubina)	Trato GI (evacuações/dia)
0	DECH sem erupção cutânea	< 2 mg/dl	Adulto: < 500 ml/dia Criança: < 10 ml/kg/dia
1	Erupção Cutânea macropapular < 25% ASC	2-3 mg/dl	Adulto: 500-999 ml/dia Criança: 10-19.9 ml kg/dia ou náusea persistente, vômitos, ou anorexia com uma biópsia GI superior positiva.
2	Erupção Cutânea macropapular 25-50% ASC	3.1-6 mg/dl	Adulto: 1000-1500 ml/dia Criança: 20-30 ml /kg/dia
3	Erupção Cutânea macropapular >50% ASC	6.1-15 mg/dl	Adulto: >1500 ml/dia Criança: >30 ml /kg/dia
4	Eritrodermia com formação de bolhas generalizada	>15 mg/dl	Severa dor abdominal ou íleo

Legenda: ASC: área de superfície corporal, GI: gastrointestinal.

Fonte: Glucksberg *et al.* Transplantation 1974;18:295-304; Thomas *et al.* New England Journal of Medicine 1975;292: 895-902. (GLUCKSBERG *et al.*, 1974; THOMAS *et al.*, 1975)

Tabela 4 — Graus de DECH

Grau	Grau de envolvimento no órgão
I.	Estágio 1-2 erupção cutânea; sem envolvimento intestinal; sem envolvimento hepático; sem diminuição no desempenho clínico.
II.	Estágio 1-3 erupção cutânea; estágio 1 de envolvimento intestinal ou estágio 1 de envolvimento hepático (ou ambos); leve diminuição no desempenho clínico.
III.	Estágio 2-3 erupção cutânea; estágio 2-3 de envolvimento intestinal ou estágio 2-4 de envolvimento hepático (ou ambos); diminuição acentuada no desempenho clínico.
IV.	Semelhante ao grau III com estágio 2-4 de envolvimento de órgãos e diminuição extrema de desempenho clínico.

Fonte: Glucksberg *et al.* Transplantation 1974;18:295-304; Thomas *et al.* New England Journal of Medicine 1975;292: 895-902. (GLUCKSBERG *et al.*, 1974; THOMAS *et al.*, 1975)

Tabela 5 — Critério do IBMTR para o índice de DECH aguda

Índice*	Pele		Fígado		TGI	
	Estágio (máx)	Extensão rash	Estágio (máx)	Bilirrubina (µmol/L)	Estágio (máx)	Diarreia (mL/d)
A	1	<25%	0	<34	0	<500
B	2	25-50%	ou 1-2	34-102	ou 1-2	550-1000
C	3	>50%	ou 3	103-225	ou 3	>1500
D	4	Bolhas	ou 4	>255	ou 4	Dor severa e íleo

Legenda: TGI: trato gastrointestinal; *Índice baseado no máximo envolvimento em sistema de órgãos individuais.

Fonte: Rowlings PA *et al.* British Journal of Haematology 1997; 97: 855-864. (ROWLINGS *et al.*, 1997)

2.4.4 Fatores preditivos de DECHa

Apesar dos avanços nos métodos de tipagem do doador, na melhora na seleção de doadores e da supressão imune pós-transplante, a DECHa, permanece sendo uma das causas de significativa mortalidade e morbidade seguida do TCTH-alo (COURIEL *et al.*, 2004; GOKER; HAZNEDAROGLU; CHAO, 2001). Além de fatores genéticos, outros fatores de risco estão associados com o desenvolvimento da doença, como idade elevada do doador e receptor (EISSNER *et al.*, 1995; GALE *et al.*, 1987; MARTIN *et al.*, 2003; WEISDORF;

HAKKE, 1991), disparidade de sexo, doador feminino múltipara (GALE *et al.*, 1987; NASH *et al.*, 1992), estágio avançado da doença no momento do transplante (HAHN *et al.*, 2008; NASH *et al.*, 1992), tipo do doador (GALE *et al.*, 1987) profilaxia de DECH inefetiva, intensidade do regime de condicionamento (GALE *et al.*, 1987; NASH *et al.*, 1992) e a origem da célula hematopoética (CUTLER *et al.*, 2001; EAPEN *et al.*, 2007; VIGORITO *et al.*, 1998).

2.4.4.1 Fatores HLA-dependentes

1- Indivíduos imunologicamente idênticos expressam proteínas na superfície de suas células codificadas pelo sistema HLA, o qual está localizado no braço curto do cromossomo 6(p21) (figura 5). Este abrange mais de 4 megabases e contém mais de 200 genes formando o MHC, apresentando um papel central na mediação da resposta imune humoral e celular. Os HLAs de classe I (HLA-A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP) são moléculas de superfície celulares que além de determinar a histocompatibilidade controlam o reconhecimento das células T (GOKER; HAZNEDAROGLU; CHAO, 2001). Proteínas HLA de classe I são expressas, em quantidades variáveis, em quase todas as células nucleadas do corpo. Proteínas HLA de classe II são expressas seletivamente em células do sistema imune (linfócitos B, linfócitos T ativados, células dendríticas e monócitos), mas sua expressão pode ser induzida em muitos outros tipos celulares (PETERSDORF; MALKKI, 2006). O HLA classe II é encontrado abundantemente na pele e epitélio do TGI e pode contribuir para sítios de órgãos específicos da DECHa (GOKER; HAZNEDAROGLU; CHAO, 2001). Conforme mencionado anteriormente, células T CD8+ ligam-se nas moléculas HLA de classe I, enquanto as células T CD4+ são hábeis em reconhecer antígenos estranhos através da apresentação de moléculas HLA classe II (NEEFJES *et al.*, 2011). Para o TCTH-alo, os genes mais influentes são os

HLA de classe I. Estes genes são altamente polimórficos, mais que 125 alelos HLA-A, 260 HLA-B, 75 HLA-C, 225 HLADRB1 e 40 HLA-DQB1 já foram descritos (BODMER *et al.*, 1995; MARSH, 2018).

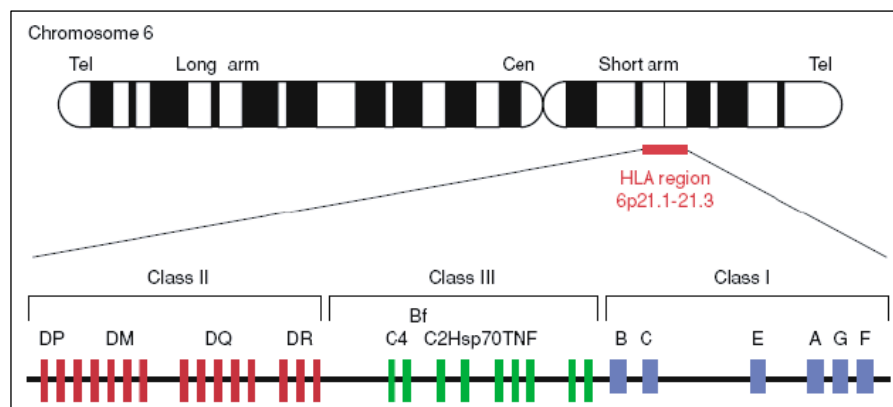
Os antígenos de classe I estão associados com o aumento da incidência de rejeição do enxerto, mas não apresentam impacto na DECH, enquanto a compatibilidade dos antígenos de classe II está associada com o aumento de DECH, sem impacto na rejeição do enxerto (PETERSDORF *et al.*, 1997, 1998).

2- mHAs (antígenos menores de histocompatibilidade): são peptídeos intracelulares, que resultam da degradação proteolítica de proteínas endógenas que são transportadas para o retículo endoplasmático, onde podem se ligar a moléculas de HLA humanas, e passar para o complexo de Golgi, quando finalmente são apresentados na superfície formando um complexo com o sistema HLA. No transplante alogênico, polimorfismos no genoma do receptor podem resultar na expressão de proteínas e peptídeos que são diferentes daqueles encontrados nas células do doador. Os antígenos de histocompatibilidade são gerados pelo polimorfismo nucleotídico nas sequências codificantes de genes, que levam a diferenças nas sequências de aminoácidos das proteínas homólogas entre as células de doadores e receptores. Isso pode resultar na clivagem proteossômica alterada, transporte de peptídeo, ligação HLA, contato com TCR, causando reconhecimento das células T do doador destes antígenos como estranhos (BLEAKLEY; RIDDELL, 2004; BUEGER *et al.*, 1992; DEN HAAN *et al.*, 1995). Estes antígenos menores expressam polimorfismos que são codificados por uma variedade de genes e são importantes no princípio de DECH em irmãos HLA idênticos (GOULMY, 1996). mHAs humanos são principalmente, mas não exclusivamente, restrito a HLA classe I. A expressão de alguns mHAs é limitada ao sistema hematopoético (HA-1 e HA-2), enquanto que outros antígenos menores são amplamente expressos (HA-Y e HA-3). Constata-se então,

que a incompatibilidade entre doador e receptor para HA-1, HA-2 e HA-5 está associada com aumento do risco de DECH (DICKINSON; CHARRON, 2005).

Doadores e receptores irmãos que tenham antígenos HLA idênticos apresentam melhores resultados no TCTH com reduzidas taxas e severidade de DECHa (MARTIN *et al.*, 1998). Assim, a incidência de DECH é diretamente relacionada à disparidade HLA (HAHN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2007; LOISEAU *et al.*, 2007). Quanto maior a incompatibilidade-HLA, maior a probabilidade de desenvolver DECH (FLOMENBERG *et al.*, 2004). Dados recentes do *National Marrow Donor Program* (NMDP) sugerem que compatibilidade de alta resolução para HLA-A, -B, -C e -DRB1 maximiza a sobrevida pós-transplante (BRAY *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2007). Mas, apesar da identidade HLA entre pacientes e doadores, a incidência de DECHa varia de 26% a 32% em receptores de doadores irmãos HLA compatíveis, e 42% a 52% em receptores de doadores não relacionados. Isso mostra que a incidência da doença pode estar relacionada a diferenças genéticas que estão fora do locus HLA, ou ao mHA (GOULMY, 1996).

Figura 5 — Localização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) no braço curto cromossomo 6



Fonte: Berlingerio *et al.* Biomedical Data and Applications 2009;224:211-236. (BERLINGERIO *et al.*, 2009)

2.4.4.2 Doadores do sexo feminino e receptores masculinos

Doadores do sexo feminino e receptores de sexo masculino podem aumentar o risco de DECHa, principalmente quando a doadora é aloimunizada devido a múltiplas gestações prévias (REMBERGER *et al.*, 2008). Isto pode ser devido à diferença de compatibilidade de antígenos menores, que estão presentes em receptores do sexo masculinos, codificados no cromossoma Y (antígenos HA-Y) e podem ser reconhecidos pelo enxerto do doador do sexo feminino causando aloreatividade (FLOWERS *et al.*, 2011).

2.4.4.3 Multiparidade nos doadores

A multiparidade nos doadores está associada com o risco aumentado de DECH, secundária a aloimunização materna (FLOWERS *et al.*, 1990). Em transplantes haploidênticos, a compatibilidade para antígenos paternos aumenta o risco de DECH comparado com antígenos maternos não herdados, sugerindo que a exposição no útero para antígenos maternos pode levar ao efeito imune de longa duração (ROOD *et al.*, 2002). Doadores relacionados são mais propensos a compartilharem mHAs, e devem apresentar menos aloreatividade. Assim, não é surpreendente que TCTH de um doador, não relacionado, tenha um risco aumentado de DECH aguda (ROOD *et al.*, 2002).

2.4.4.4 Regime de condicionamento

Poucos estudos avaliaram o impacto do regime de condicionamento mieloablativo versus não-mieloablativo na incidência de DECHa (LIU *et al.*, 2013; MIELCAREK; STORB, 2005; SORROR; MARTIN; STORB, 2014). O regime de condicionamento de intensidade reduzida causa menos danos e resulta em menor incidência de DECHa (GLUCKMAN *et al.*,

1997; MIELCAREK *et al.*, 2003), enquanto que radiação corporal total causa o aumento da doença (FLOWERS *et al.*, 2011; NASSEREDDINE *et al.*, 2017).

2.4.4.5 Quimerismo

O quimerismo completo do doador (todas as células detectáveis são de origem do doador) está associado com menor incidência de DECH que quimerismo misto (população mista de células do doador e receptor detectáveis) (SVENBERG *et al.*, 2009).

2.4.4.6 Infecções

A microflora intestinal pode gerar DECH, assim a administração de antibióticos pode atenuar o risco de desenvolver a doença (BEELLEN *et al.*, 1999). A positividade para citomegalovírus (CMV) também implica em risco de DECHa, assim se o doador ou o receptor for positivo para CMV, o risco de DECH é maior, enquanto se os dois forem negativos, o risco é reduzido (HAHN *et al.*, 2008).

2.4.4.7 Idade

A idade do doador e receptor pode ser um fator prognóstico importante para o desenvolvimento e severidade de DECH. Sabe-se que o risco de DECHa aumenta com a idade do paciente. O mecanismo é desconhecido, mas acredita-se que a involução do timo que ocorre, naturalmente, com o aumento da idade leva à perda da seleção negativa de clones de células T reativas do hospedeiro (FLOWERS *et al.*, 2011; HAHN *et al.*, 2008). O regime de condicionamento pode induzir ao dano tecidual nas células epiteliais do timo e a diminuição da habilidade de produzir IL-7 (CHUNG *et al.*, 2001), uma citocina necessária à sobrevivência e

desenvolvimento do timócito. Assim, a reduzida capacidade para gerar novas células T é atribuída ao aumento da idade e também a intensidade do regime de condicionamento (MACKALL *et al.*, 1995, 1997).

2.4.4.8 Fonte de células

Durante a última década, houve uma mudança na prática clínica do uso de CTH da MO para as células obtidas do SP, após mobilização por fatores de crescimento, como o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF), como fonte de células hematopoéticas. Entretanto, uma meta-análise mostrou que a DECH aguda é mais frequente pós-transplante de CTH do sangue periférico comparada com transplante de medula óssea (CUTLER *et al.*, 2001). O SCU é uma alternativa a MO e SP (LAUGHLIN *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2002) para pacientes sem doadores HLA compatível.

O TCTH utilizando o SCU apresenta uma incidência e severidade de DECH aguda mais baixa que o de MO de doador não aparentado HLA compatível (GREWAL *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2004). O uso do SCU apresenta muitas vantagens como, por exemplo: fácil disponibilidade, potencial reduzido para transmissão viral e presença de células imunes relativamente imaturas (células T *naives*) (GARDERET *et al.*, 1998). Estes fatores reduzem a incidência de DECH (BRADLEY; CAIRO, 2005). Todavia, as células do SCU contêm menos CTH que outras fontes, isto retarda a pega hematológica, aumenta o risco de infecção e aumenta o período de mortalidade pós-transplante. Este tipo de fonte de células é associado à recuperação tardia da celularidade e risco aumentado de falhas do transplante, o que coloca o paciente em risco para hemorragias e/ou infecções (SINGH; MCGUIRK, 2016).

2.5 REGIME DE CONDICIONAMENTO

Nos primeiros 30 anos, o TCTH-alo foi baseado no uso de radiação mieloablativa de intensidade máxima com ou sem quimioterapia, na busca de atingir os seguintes objetivos: 1) erradicar as células tumorais; 2) suprimir o sistema imune do receptor para prevenir a rejeição do transplante e 3) criar espaço na medula óssea para facilitar a pega da CTH (THOMAS *et al.*, 1977). Posteriormente, foi introduzido o regime de condicionamento livre de radiação, utilizando a combinação de busulfan e ciclofosfamida (JONES, 1989).

O regime de condicionamento é classificado em mieloablativo, condicionamento de intensidade reduzida (RIC-*Reduced-Intensity Conditioning*), e não mieloablativo (GIRALT *et al.*; 2009). Regimes mieloablativo ou de “altas doses” consistem no uso de agentes alquilantes (individuais ou múltiplos) com ou sem TBI, com a finalidade de levar à ablação a hematopoese da medula. Em contraste, o regime não mieloablativo, causa citopenias mínimas e não requer suporte de CTH (BACIGALUPO *et al.*, 2009). Regimes de condicionamento que não entram na definição de mieloablativo ou não mieloablativo são classificados como RIC: eles resultam em citopenias potencialmente prolongadas, e requerem um suporte de CTH. Os protocolos atuais do TCTH incluem um regime de condicionamento mielossupressor, com o objetivo de depletar a CTH do hospedeiro e permitir a pega da célula do doador, e imunossupressão para reduzir a rejeição.

2.5.1 Regime de condicionamento de altas doses

2.5.1.1 Regime de irradiação corporal total

Altas doses de irradiação corporal total (*Total Body Irradiation-TBI*) são amplamente utilizadas como parte do regime de condicionamento, devido a propriedades

imunossupressoras, sua eficácia contra muitas leucemias e linfomas, e sua habilidade para penetrar no sítio santuário. A maioria dos regimes combina TBI, geralmente dose fracionada, com outros agentes quimioterápicos, mais frequentemente ciclofosfamida, baseado na sua propriedade antineoplásica e imunomodulatória (BROCHSTEIN; KERNAN, 1987; CLIFT *et al.*, 1990; THOMAS *et al.*, 1982). Em geral, altas doses de TBI resultam num aumento, frequentemente fatal, de toxicidade gastrointestinal, hepática e, de malignidade secundária e prejuízo no crescimento e desenvolvimento em crianças (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014).

Além da ciclofosfamida, vários agentes são combinados com altas doses de TBI, tais como citarabina (AraC) (RIDDELL; APPELBAUM, 1988), etoposídeo (HORNING *et al.*, 1991), melfalan (MOREAU *et al.*, 2002) e busulfan (SCOTT *et al.*, 2004), embora não existam evidências que mostrem que essas combinações são superiores ao uso de ciclofosfamida (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014).

2.5.1.2 Regime baseado em altas doses de quimioterapia (mieloablativo)

Para evitar a toxicidade a curto e longo prazo associada às altas doses de TBI, os regimes de condicionamento baseados em elevadas doses de quimioterapia foram desenvolvidos, onde o TBI foi substituído por agentes quimioterápicos adicionais. Agentes alquilantes permanecem o principal componente de tais regimes, devido ao perfil de toxicidade favorável e do efeito nas células tumorais (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014). O regime mieloablativo é constituído pela administração de quimioterapia intensiva, frequentemente combinada com TBI, antes das células serem transplantadas. A quimioterapia intensiva apresenta significativa atividade antitumoral, mas diminui a hematopoese do hospedeiro e a imunidade (BLEAKLEY; RIDDELL, 2004).

Busulfan é um agente alquilante com profundo efeito tóxico nas células que não estão em divisão na medula, incluindo precursores mieloides imaturos. Atuam em uma variedade de malignidades, incluindo leucemia mieloide crônica e outras desordens mieloproliferativas, linfomas, leucemias agudas e mieloma múltiplo. Mas o Busulfan não pode ser administrado como único agente no condicionamento do TCTH, devido a sua limitada toxicidade para linfócitos maduros tumorais (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014). Recentemente, em regimes desenvolvidos visando à redução da toxicidade, a ciclofosfamida foi substituída pela fludarabina, um análogo nucleosídeo com consideráveis propriedades imunossupressoras que também apresenta um efeito sinérgico com alquilantes pela inibição do reparo do DNA. A combinação de busulfan e fludarabina mostrou ter um perfil de toxicidade mais favorável em pacientes com leucemias mieloide (BORNHÄUSER *et al.*, 2003; IRAVANI *et al.*, 2007).

2.5.2 Regime de condicionamento não mieloablativo e intensidade reduzida

Atualmente um novo enfoque do TCTH-alo consiste num regime de condicionamento com baixas doses de quimioterapia ou radioterapia, suficiente para permitir a enxertia das CTH do doador. Regimes de condicionamento de intensidade reduzida e não-mieloablativo torna o TCTH-alo uma opção terapêutica acessível a idosos e pacientes com a função de órgãos comprometida, que previamente não podiam receber altas doses de medicação (GYURKOCZA; SANDMAIER, 2014).

O regime não mieloablativo consiste no uso de fludarabina e baixas doses de quimioterapia ou TBI. Este condicionamento menos intensivo, não é mieloablativo, mas é suficientemente imunossupressivo para permitir a pega da CTH do doador, também leva a uma diminuição da toxicidade do órgão, pancitopenia e mortalidade inicial, comparado com o

regime mieloablativo (CHAMPLIN *et al.*, 2000; KHOURI *et al.*, 2001; MALONEY *et al.*, 2013; MARIS *et al.*, 2003).

2.6 EFEITO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA

Observações do final dos anos 1970 e início de 1980 sugerem que pacientes que desenvolveram DECH após o TCTH obtiveram uma melhor sobrevida livre de doença. Isso levou ao reconhecimento de que pacientes com doenças hematológicas podem ter benefícios particulares pela substituição da medula óssea do paciente pela do doador, onde o sistema imune do doador reconhece células de tumor, residuais no receptor, como elementos estranhos e podem atacar estas células tumorais, (BLEAKLEY; RIDDELL, 2004), fenômeno conhecido como enxerto-contraleucemia (*graft-versus-leukemia-GVL*), contribuindo para a cura da doença maligna (SULLIVAN *et al.*, 1989; WEIDEN *et al.*, 1979). Este efeito é positivo, pois diminui as recidivas da doença de base. A hipótese que os efeitos do *GVL* são capazes de erradicar doenças malignas levou ao desenvolvimento do regime de condicionamento de intensidade reduzida.

O papel das células T torna-se evidente neste processo, pois foi demonstrado que a depleção das células T elimina a DECH às custas de um aumento da taxa de recaída (APPERLEY *et al.*, 1988). O maior efetor do *GVL* são as células T citotóxicas (CD8+), juntamente com células NK e células TNK, que reconhecem os antígenos de histocompatibilidade e antígenos tumorais.

2.7 BIOMARCADORES

O diagnóstico da DECHa inclui a clínica, levando em consideração os sintomas do paciente, os valores de testes laboratoriais e a histologia do tecido afetado. Na atualidade, não

há um biomarcador que possa ser utilizado na rotina clínica como preditor de DECH, porém a identificação de marcadores específicos, medidos em amostras do sangue periférico pode ser de grande utilidade no diagnóstico e ser um importante instrumento clínico. Os biomarcadores específicos para o diagnóstico de DECHa têm como objetivo eliminar procedimentos invasivos como a biópsia, além de refinar o diagnóstico e guiar a terapia, melhorando o prognóstico para pacientes submetidos ao TCTH-alo (CHEN; CUTLER, 2013).

O uso de biomarcadores sanguíneos, preditivos e não invasivos são necessários para melhorar o diagnóstico e otimizar o cuidado nos receptores do TCTH-alo (TOUBAI *et al.*, 2012b). O maior desafio é a ausência de testes laboratoriais que possam ser utilizados com essa finalidade. Portanto, testes sanguíneos, moleculares ou sorológicos, para prever a DECH (PACZESNY *et al.*, 2009) podem ser úteis para identificar grupos de risco, determinando a resposta ao tratamento (CHOI; LEVINE, 2010). O uso dos biomarcadores para o diagnóstico de DECHa permanece uma área de ativa investigação (NASSEREDDINE *et al.*, 2017; PACZESNY, 2018).

2.7.1 Genes inflamatórios/imunoreguladores

A liberação de citocinas tem um papel importante na regulação da resposta imune. Polimorfismos nos genes das citocinas, principalmente polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) ou microssatélites, localizados na região promotora ou outras regiões regulatórias, afetam o gene de transcrição e causam variações interindividuais, na produção destas proteínas (ESKDALE *et al.*, 1998; FISHMAN *et al.*, 1998). Assim, cada pessoa tem um perfil único de alta ou baixa produção de citocinas. Portanto, alguns indivíduos podem ser mais susceptíveis a condições inflamatórias e o desenvolvimento de resposta imune após o transplante (BENNERMO *et al.*, 2004). Além disso, características polimórficas de genes

codificadores de citocinas estão associadas com o prognóstico do TCTH-alo (BOGUNIA-KUBIK; POLAK; LANGE, 2003; DICKINSON *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2003; MLYNARCZEWSKA *et al.*, 2004; MULLIGHAN *et al.*, 2004; SOCIE *et al.*, 2001).

Vários estudos investigaram estes polimorfismos nos genes das citocinas que modulam a atividade e/ou a influência das citocinas no risco da doença (HARRIS; FERRARA; LEVINE, 2013). Há uma variedade de polimorfismos associados à DECHa, como nos genes do *TNF-alfa*, *IL-10*, *IL-6* e *INF-gama*, (CAVET *et al.*, 1999; DICKINSON; CHARRON, 2005; LIN *et al.*, 2003). Atualmente, não existem evidências que genes polimórficos para citocinas ou outras proteínas envolvidas na imunidade inata (HOLLER *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2007; VELARDI *et al.*, 2002) influenciem suficientemente na DECH e no prognóstico do transplante com impacto na prática clínica. Entretanto, futuras estratégias para identificar o melhor doador para o transplante, provavelmente, incorporarão além de fatores genéticos HLA, os fatores não-HLA (CHOI; LEVINE, 2010).

2.7.1.1 Gene da *Interleucina-10 (IL-10)*

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1(1q31-1q32). Apresenta três únicos SNPs na região promotora nas posições -1082 G/A (rs1800986), -819 C/T (rs1800871), e -592 C/A (rs1800872) (ESKDALE *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 1997), que afetam a transcrição, produção e secreção da IL-10 (YILMAZ; YENTÜR; SARUHAN-DIRESKENELI, 2005).

Alguns autores mostraram a influência desses polimorfismos da região produtora do gene da *IL-10* no risco de DECHa. Três haplótipos comuns representam alta (GCC), intermediária (ATA) e baixa (ACC) produção de IL-10 (LIN *et al.*, 2003; SOCIE *et al.*, 2001). Como esperado, a presença de haplótipos (GCC) de alta produção nos receptores de

TCTH, correlaciona-se com o risco diminuído de DECHa (GOUSSETIS *et al.*, 2011) e os genótipos que produzem baixos níveis de IL-10 têm aumento da incidência da doença após o TCTH-alo (CAVET *et al.*, 2001; MIDDLETON *et al.*, 2002; NORDLANDER *et al.*, 2002). Também foi encontrado que o alelo A da IL-10 -592 no receptor, apresenta baixo risco de DECHa (LIN *et al.*, 2003) e melhor sobrevida (LIN *et al.*, 2005).

Alguns estudos mostram associação entre os polimorfismos do gene da *IL-10* posições -592, -819 e -1082 com o baixo risco de DECHa (BERTINETTO *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2013), outros mostram associação com a alta incidência de DECHa (KARABON *et al.*, 2005; SIVULA *et al.*, 2009) e outros não encontraram associação (AZARPIRA *et al.*, 2008; CAVET *et al.*, 1999; MULLIGHAN *et al.*, 2004; TAMBUR *et al.*, 2001). Os resultados dos estudos permanecem conflitantes, em relação ao efeito dos polimorfismos no gene da *IL-10* na DECHa.

2.7.1.2 Gene do *Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa)*

O gene que codifica a citocina pró-inflamatória TNF-alfa está localizado no locus do MHC no cromossomo 6. Em relação aos estudos realizados, esses encontraram polimorfismos na região promotora do gene do *TNF-alfa*, nas posições -308 (G/A) e -238 (G/A) (ABRAHAM; FRENCH; DAWKINS, 1993; BRINKMAN *et al.*, 1994). O alelo A (TNFA2) do *TNF-alfa* -308 está associado com aumento da expressão da citocina TNF-alfa (MIDDLETON *et al.*, 1998). Foram encontrados baixos níveis de TNF-alfa nos genótipos HLADR2 e altos níveis, nos genótipos HLADR3 e HLADR4 (JACOB *et al.*, 1990), sugerindo a existência inerentemente de produção alta ou baixa TNF-alfa na população.

O *TNFD* é um dinucleotídeo com sequência repetida que está posicionada abaixo do gene *TNF* para o qual diferentes alelos foram encontrados e alteram a produção de TNF-alfa.

Os genótipos TNFd3/d3 e d4/d4 estão associados com aumento da produção da citocina comparados a outros polimorfismos, entretanto os pacientes portadores destes genótipos mostraram associação com a presença de DECH em alguns estudos (CAVET; DICKINSON, 2001; MIDDLETON *et al.*, 1998; NORDLANDER *et al.*, 2002), mas não em outros (SHAH *et al.*, 2009; VIEL *et al.*, 2007). Não foi encontrada associação entre o polimorfismo na região promotora do gene *TNF*, posição -308, com a produção aumentada de TNF-alfa, e risco de DECHa (KARIMI; SALEK; YAGHOBI, 2019; LIN *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 1998; NORDLANDER *et al.*, 2002; ROCHA, 2002; SOCIE *et al.*, 2001).

2.7.1.3 Gene do *Interferon gama (INF-gama)*

O gene do *INF-gama* está localizado no cromossomo 12q24.1 (FRUCHT *et al.*, 2001). O polimorfismo *INF-gama*2* é associado com a timina na posição +874 T/A e 12 nucleotídeos repetidos, enquanto os alelos 3, 4 e 5 têm uma adenina na +874, mas possuem diferentes números de nucleotídeos repetidos (PRAVICA *et al.*, 2000). O *INF-gama*2* é associado com alta produção da citocina *INF-gama* que outros alelos. O *INF-gama*3* no receptor pode aumentar a probabilidade de DECHa (CAVET *et al.*, 2001; MIDDLETON *et al.*, 2002), enquanto *INF-gama*2* pode apresentar um efeito protetor (MLYNARCZEWSKA *et al.*, 2004). Socie *et al.* não encontrou correlação significativa entre o polimorfismo do *INF-gama* +874 (T/A) no doador ou receptor com o risco de DECH (SOCIE *et al.*, 2001). A associação do genótipo de alta produção do *INF-gama* com o baixo risco de DECH sugere que a produção de *INF-gama* no cenário do TCTH-alo pode ter um efeito de maior tolerância imune, talvez através da indução da secreção de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas CAA, em vez de efeito pró-inflamatório, como esperado, quando *INF-gama* está presente em alta concentração (LU; WALLER, 2010).

2.7.1.4 Gene da *Interleucina-6 (IL-6)*

O gene da *IL-6* contém quatro éxons e quatro íntrons e está localizado no braço longo do cromossomo 7 (região 7p21). A região promotora do gene da *IL-6* apresenta um SNP (G/C) na posição -174 (RAY *et al.*, 1988). A presença do polimorfismo do gene da *IL-6* contendo o alelo G na posição -174 está associada com aumento dos níveis no soro da citocina em indivíduos normais (FISHMAN *et al.*, 1998).

Pesquisas têm demonstrado que receptores (AMBRUZOVA *et al.*, 2009; MIDDLETON *et al.*, 2003) ou doadores (KARABON *et al.*, 2005; MULLIGHAN; BARDY, 2004) homozigotos para o gene da *IL-6* -174 com o genótipo GG correlacionam-se com altas taxas de DECH comparados com não-homozigotos, embora outros estudos não tenham encontrado associação (LIN *et al.*, 2003). Variação de nucleotídeos nos genes afetam a translação e transcrição da sua citocina correspondente. Como a DECH é uma doença mediada imunologicamente, é provável que variações nos genes modulem a progressão e severidade da doença (TING *et al.*, 2013).

2.7.2 Variação étnica dos polimorfismos dos genes das citocinas

Polimorfismos, nos genes das citocinas, resultam em variações interindividuais da regulação da transcrição e, conseqüentemente, diferentes níveis no soro de citocinas. Como estes polimorfismos são secretados independentemente, cada pessoa é um mosaico de fenótipo de alta, intermediária e baixa produção. Está bem estabelecido que a frequência de diferentes alelos dos genes das citocinas varia entre diferentes populações (FISHMAN *et al.*, 1998; PRAVICA *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997). A frequência dos polimorfismos dos genes *IL-10*, *IL-6*, *INF-gama* e *TNF-alfa*, em diferentes populações, é mostrada nas tabelas: 6, 7, 8 e 9 respectivamente.

Tabela 6 — Frequência (%) dos genótipos da *IL-10* e distribuição dos alelos em diferentes populações

	n	Genótipo			Alelos		Referência
		AA	AG	GG	A	G	
<i>IL-10</i> -1082							
População Asiática							
Malásia	60	88,3	11,5	0	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
Singapura Chinesa	83	95,1	4,9	0	97,5	2,5	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
População Europeia							
Italianos Caucasianos	726	NR	NR	NR	63,00	37,00	(REYNARD <i>et al.</i> , 2000)
Sudeste Inglaterra	152	NR	NR	NR	47,4	52,6	(REYNARD <i>et al.</i> , 2000)
Itália	77	31,0	49,0	19,0	56,0	44,0	(BERTINETTO <i>et al.</i> , 2006)
Itália	140	34,0	54,0	12,0	61,0	39,0	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)
População Americana							
Brasil	211	39,3	44,1	16,6	61,4	38,6	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
América	101	28,7	54,5	16,8	55,4	44,6	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro-Americanos	41	36,6	61,0	2,4	67,1	32,9	(COX <i>et al.</i> , 2001)
<i>IL-10</i> -1082							
Zulu (África)	86	33,4	57,1	9,5	61,9	38,1	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Omani	80	44,3	41,8	13,9	65,2	34,8	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Mexicanos Mestiços	40	46,2	35,9	17,9	64,1	35,9	(GORODEZKY <i>et al.</i> , 2001)
Irlanda do Norte	100	19,4	46,2	34,4	42,5	57,5	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Manchester, RU	660	NR	NR	NR	94,0	49,0	(REYNARD <i>et al.</i> 2000)
<i>IL-10</i> -819							
População Asiática							
Singapura Chinesa	83	45,7	43,2	11,1	67,3	32,7	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
População Europeia							
Itália Caucasianos	726	NR	NR	NR	29,2	70,8	(REYNARD <i>et al.</i> 2000)
Sudeste da Inglaterra	152	NR	NR	NR	16,5	83,6	(REYNARD <i>et al.</i> 2000)
Malásia	62	45,9	44,3	9,8	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
Itália	77	10,0	39,0	51,0	30,0	70,0	(BERTINETTO <i>et al.</i> , 2006)
Itália	140	6,0	44,0	50,0	28,0	72,0	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)
População Americana							
Brasil	211	10,0	43,6	46,4	31,8	68,2	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
América	102	5,9	41,6	52,5	26,7	73,3	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro-Americano	41	26,8	63,4	9,8	41,5	58,5	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Manchester, RU	660	NR	NR	NR	23,0	33,0	(REYNARD <i>et al.</i> 2000)

Irlanda do Norte	100	1,1	34,4	64,5	18,3	81,7	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Zulu (África)	86	6,0	56,0	38,0	33,9	66,1	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Omani	80	6,3	36,7	57,0	24,7	75,3	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Mexicanos Mestiços	40	17,9	46,2	35,9	41,0	59,0	(GORODEZKY <i>et al.</i> , 2001)
<i>IL-10 -592</i>		AA	CA	CC	A	C	
População Asiática							
Singapura Chinesa	83	45,7	43,2	11,1	67,3	32,7	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Malásia	61	44,3	45,9	9,8	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
População Europeia							
Itália Caucasianos	726	NR	NR	NR	70,8	29,2	(REYNARD <i>et al.</i> , 2000)
Sudeste da Inglaterra	152	NR	NR	NR	83,6	16,45	(REYNARD <i>et al.</i> , 2000)
<i>IL-10 -592</i>							
Norte da Irlanda	100	1,1	34,4	64,5	18,3	81,7	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Itália	77	10,0	39,0	51,0	30,0	70,0	(BERTINETTO <i>et al.</i> , 2006)
Itália	140	6,0	44,0	50,0	28,0	72,0	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)
População Americana							
Brasil	211	10,0	43,6	46,4	31,8	68,2	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
América	102	5,9	41,6	52,5	26,7	73,3	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro-Americano	41	9,8	63,4	26,8	41,5	58,5	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Zulu (África)	86	6,0	56,0	38,0	33,9	66,1	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Omani	80	6,3	36,7	57,0	24,7	75,3	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Mexicanos Mestiços	40	17,9	46,2	35,9	67,3	32,7	(GORODEZKY <i>et al.</i> , 2001)
Manchester, RU	660	NR	NR	NR	33,0	23,0	(REYNARD <i>et al.</i> , 2000)

Legenda: NR: não realizado.

Tabela 7 — Frequências (%) dos genótipos da *IL-6 -174 G/C* e distribuição dos alelos em diferentes populações

	n	Genótipo			Alelos		Referência
		GG	GC	CC	G	C	
<i>IL-6 -174</i>							
População Asiática							
Norte Índia	243	50,1	35,0	14,9	67,6	32,4	(KESARWANI <i>et al.</i> , 2008)
Sul Índia	210	71,9	25,2	2,9	84,7	15,5	(BHANOORI <i>et al.</i> , 2005)
Índia Asiática	40	75,0	17,5	7,5	83,7	16,2	(MAITRA <i>et al.</i> , 2008)

China	217	33,2	51,6	15,2	59,0	41,0	(JENG <i>et al.</i> , 2005)
China	105	3,8	36,2	60,0	1,9	78,1	(HONG <i>et al.</i> , 2005)
China	232	99,6	0,43	0,0	99,8	0,32	(PAN <i>et al.</i> , 2011)
Singapura Chinesa	83	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Coréia	1037	99,5	0,48	0,0	99,8	0,24	(PARK <i>et al.</i> , 2003)
Japão	311	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	(OGNJANOVIC <i>et al.</i> , 2010)
Malásia	61	96,7	3,3	0,0	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
População Europeia							
Espanha	311	46,6	42,8	10,6	68,0	32,0	(LANDI <i>et al.</i> , 2003)
Espanha	157	46,5	40,0	11,5	67,5	32,5	(COLLADO-ESCOBAR <i>et al.</i> , 2000)
Espanha	57	45,6	43,9	10,5	67,5	32,5	(CALVO <i>et al.</i> , 2002)
Inglaterra	383	37,6	44,1	18,3	59,7	40,3	(FISHMAN <i>et al.</i> , 1998)
Polónia	50	32,0	56,0	12,0	60,0	40,0	(MAZUR <i>et al.</i> , 2005)
Irlanda	100	30,0	48,0	22,0	54,0	46,0	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
República Checa	105	34,3	43,8	21,9	56,2	43,8	(VASKU <i>et al.</i> , 2004)
<i>IL-6 -174</i>							
Itália Caucásiano	362	49,7	39,3	11,0	71,0	29,0	(POLI <i>et al.</i> , 2002)
Itália	86	41,0	50,0	9,0	66,0	34,0	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)
Finlândia	485	19,2	48,4	32,4	43,4	56,6	(RAVAGLIA <i>et al.</i> , 2005)
Suécia	128	25,8	53,9	20,3	52,7	47,3	(ZHENG <i>et al.</i> , 2000)
População Americana							
Brasil	213	49,3	40,8	9,9	69,7	30,3	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
Brasil	253	58,5	40,3	1,2	78,7	21,3	(DE SOUZA <i>et al.</i> , 2006)
Caucásianos	65	30,8	46,2	23,1	53,8	46,2	(HALVERSTADT <i>et al.</i> , 2005)
América	613	37,4	47,8	14,7	61,4	38,6	(MICHAUD <i>et al.</i> , 2006)
Havaí	218	4,1	21,1	74,8	14,7	85,3	(BUSHLEY <i>et al.</i> , 2004)
Americano	102	45,1	39,2	15,7	64,7	35,3	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro-Americanos	43	81,4	18,6	0,0	90,7	9,3	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro-Caribenhos	101	91,1	8,9	0,0	85,5	4,5	(FISHMAN <i>et al.</i> , 1998)
Coréia do Sul	202	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	(LEE <i>et al.</i> , 2002)
Áustria	94	36,2	46,8	17,0	59,6	40,0	(WIESER <i>et al.</i> , 2003)
Zulu (África)	86	98,8	1,2	0,0	99,4	0,6	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Mexicanos Mestiços	40	90,0	7,5	2,5	93,8	6,2	(GORODEZKY <i>et al.</i> , 2001)
Irlanda do Norte	100	30,0	48,0	22,0	54,0	46,0	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Omani	80	76,2	22,5	1,3	87,5	12,5	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)

Legenda: NR: não realizado.

Tabela 8 — Frequência (%) dos genótipos da *TNF-alfa* e distribuição dos alelos em diferentes populações

	n	Genótipo			Alelos		Referência
		GG	GA	AA	G	A	
<i>TNF-alfa</i> -238							
População Asiática							
Malásia	61	91,8	8,2	0,0	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
<i>TNF-alfa</i> -308							
População Asiática							
Malásia	62	78,7	21,3	0,0	NR	NR	(GAN <i>et al.</i> , 2016)
Singapura Chinesa	83	77,1	21,7	1,2	88,0	12,0	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
População Americana							
Brasil	210	73,8	26,2	0,0	86,9	13,1	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
<i>TNF-alfa</i> -308							
América	102	72,5	25,5	2,0	85,3	14,7	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Irlanda do Norte	100	61,0	32,0	7,0	77,0	23,0	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Afro-Americano	43	76,8	20,9	2,3	87,2	12,8	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Zulu (África)	86	62,8	30,2	7,0	77,9	22,1	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
Omani	80	83,8	16,2	0,0	91,9	8,1	(MEENAGH <i>et al.</i> , 2002)
México	40	95,0	5,0	0,0	97,5	2,5	(GORODEZKY <i>et al.</i> , 2001)
População Europeia							
Itália	77	84,0	13,0	3,0	91,0	9,0	(BERTINETTO <i>et al.</i> , 2006)
Itália	140	84,0	14,0	2,0	91,0	9,0	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)

Legenda: NR: não realizado

Tabela 9 — Frequência (%) dos genótipos da *INF-gama* e distribuição dos alelos em diferentes populações

	n	Genótipo			Alelos		Referência
		TT	TA	AA	T	A	
<i>INF-gama</i> +874							
População Americana							
Brasil	211	14,2	54,0	31,8	41,2	58,8	(VISENTAINER <i>et al.</i> , 2008)
América	102	20,6	53,9	25,5	47,5	52,5	(COX <i>et al.</i> , 2001)
Afro Americano	43	7,0	55,8	37,2	34,9	65,1	(COX <i>et al.</i> , 2001)
População Europeia							
Itália	140	23,0	47,0	30,0	46,5	53,5	(DE CAPEI <i>et al.</i> , 2003)

2.7.3 Citocinas

As citocinas são um grupo de polipeptídeos derivado das células, que controlam a resposta inflamatória (VARGAS-ALARCON *et al.*, 2012) e atuam como mediadores solúveis, auxiliando na comunicação célula-célula durante a resposta imune. São caracterizadas pela redundância funcional e pleiotropia. Elas incluem INFs, quimiocinas, linfocinas, interleucinas, TGF-beta, fator estimulante de colônia (CSF), e TNF (TANAKA; KISHIMOTO, 2014; TEDGUI, 2006). As citocinas também estão envolvidas em atividade sinérgica, interações antagonistas e exibem efeitos regulatórios positivos e negativos em células alvos (SHANTSILA; LIP, 2009).

As interleucinas e os INFs, são fatores solúveis com papel crucial na resposta imune, como na produção anormal de outras citocinas e estão relacionadas a várias doenças autoimunes e inflamatórias (HIRANO, 1998; HIRANO *et al.*, 1988; MARC FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996; O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

Um grande número de citocinas está envolvido na patofisiologia da DECH, observando-se a presença de um ambiente proinflamatório que pode ser atribuído ao regime de condicionamento, aloreatividade e ao dano induzido no tecido do hospedeiro (MORRIS; HILL, 2007; PIPER; DROBYSKI, 2019; SUN *et al.*, 2007).

2.7.3.1 Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é um heterodímero não covalente de 36kDa com duas cadeias de polipeptídeos, produzida por diferentes tipos celulares, incluindo células B, células T Regs, monócitos/macrófagos, células dendríticas e mastócitos (MOSMANN, 1994).

Essa é a maior citocina imunoregulatória, possuindo vários efeitos moduladores no sistema imune. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, com papel crucial na regulação do

processo inflamatório, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, bem como moléculas de adesão e co-estimulatórias em monócitos/macrófagos (MOORE *et al.*, 2001), inibindo a ativação de células Th1 (KOCH *et al.*, 2001).

A IL-10 induz anergia de células T, para inibir a expressão do MHC classe I, a síntese de citocinas inflamatórias, como IL-1alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF-alfa nos macrófagos ativados (CRAWLEY *et al.*, 1999; MALEFYT, 1991; MOORE *et al.*, 1993) e a produção do INF-gama pelas células T (D'ANDREA *et al.*, 1993), importantes para a imunossupressão. Contrária à ação inibitória de macrófagos, a IL-10 tem um potente efeito estimulatório *in vitro* nos linfócitos B, que inclui aumento da expressão de moléculas MHC classe II, produção de imunoglobulinas, e replicação do DNA (ROUSSET *et al.*, 1992), estimulando a proliferação e diferenciação de células B e de células Th2. Esta propriedade sugere que a IL-10 pode atuar como mediador supressor e prevenir a DECH (HOLLER, 2002). Já está bem documentado que em receptores de TCTH-alo, a alta produção da IL-10 está associada com um baixo risco de DECHa (ZHU *et al.*, 2013). A IL-10 tem um importante papel no controle das reações imunes durante inflamações sistêmicas. Já outros estudos mostram uma correlação entre os níveis de IL-10 e a presença de DECHa (FUJII *et al.*, 2006; HEMPEL *et al.*, 1997; MIN *et al.*, 2001; REMBERGER *et al.*, 2003; REMBERGER; RINGDÉN, 1997; SAKATA *et al.*, 2001; TAKATSUKA *et al.*, 1999; VISENTAINER *et al.*, 2003). A função anti-inflamatória apresenta associação entre aumento dos níveis de IL-10 pós TCTH-alo e a DECHa (FUJII *et al.*, 2006; HEMPEL *et al.*, 1997; MIN *et al.*, 2001; REMBERGER *et al.*, 2003; REMBERGER; RINGDÉN, 1997; SAKATA *et al.*, 2001; TAKATSUKA *et al.*, 1999). Níveis de IL-10 aumentam, significativamente, na fase neutropênica e na fase de recuperação após o transplante (TAKATSUKA *et al.*, 1999). Isto sugere que a alta concentração de IL-10 com paciente com DECHa pode ser um reflexo da inflamação sistêmica severa (TOUBAI *et al.*, 2012b).

2.7.3.2 Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa)

A molécula de TNF-alfa é uma cadeia polipeptídica única, não glicosilada, contendo 158 aminoácidos e possui uma massa molecular de 17,5 kDa. É uma citocina multidimensional produzida, principalmente, por monócitos e macrófagos. O TNF-alfa é uma potente citocina imunomediadora e pró-inflamatória que está envolvida na ativação de fatores de crescimento, citocinas e quimioatractantes, cuja função é a regulação de moléculas de adesão e expressão de moléculas do MHC e pode induzir diretamente a morte celular durante a fase efetora da DECHa (BOGUNIA-KUBIK; POLAK; LANGE, 2003; SHARMA *et al.*, 2010). Alguns estudos mostram que seus níveis no soro durante o regime de condicionamento pré-transplante está associado com a DECH aguda e sua concentração está relacionada à severidade da doença (FERRARA, 2007; HIROKAWA, 1989; HOLLER *et al.*, 1990, 1991; KAYABA *et al.*, 2000; LUNN *et al.*, 2005; MIN *et al.*, 2001; REMBERGER, 2004; REMBERGER *et al.*, 2003; SCHOTS *et al.*, 2003; VISENTAINER *et al.*, 2003), enquanto em outros estudos esta correlação não foi encontrada (CHANG *et al.*, 1999; MELICONI *et al.*, 1992; ROBINET *et al.*, 1992; SAKATA *et al.*, 2001; YASMINEH; KAUR; BLAZAR, 1995). O TNF-alfa também apresenta participação em outras complicações relacionadas ao transplante, como DVO, pneumonites, e na síndrome extravasamento endotelial grave (HOLLER *et al.*, 1990, 1991; SCHOTS *et al.*, 2003).

2.7.3.3 Interferon-gama (INF-gama)

O INF-gama é um peptídeo homodimérico de 34kD secretado pelas células T ativadas, NK e TNK. O INF-gama tem um papel central na resposta imune e inflamatória e apresenta uma diversidade de estímulos. Promove a diferenciação de células T e B, facilitando a

progressão de células T CD4 *naive* para o fenótipo Th1, a maturação das células T CD8, e o *switch* de classe das imunoglobulinas nas células B maduras (TAU; ROTHMAN, 1999).

Estudos experimentais sugerem que INF-gama está envolvido em vários aspectos da patofisiologia da DECHa (CHIK *et al.*, 2003; HILL *et al.*, 1997; NAKAMURA *et al.*, 2000; REMBERGER; RINGDÉN, 1997; VISENTAINER *et al.*, 2003; YI *et al.*, 2009). A liberação de INF-gama é o evento inicial da cascata que leva à DECH, tendo um pico no dia 7 após o TCTH-alo, antes dos sintomas clínicos aparecerem (HILL; FERRARA, 2000). Imamura *et al.* também relatou que os níveis de INF-gama aumentam, antes de 14 dias, no início da DECHa (IMAMURA; HASHINO, 1994a). Por outro lado, Visentainer *et al.* não identificou correlação significativa entre DECHa e INF-gama (VISENTAINER *et al.*, 2003). O INF-gama pode estar diretamente envolvido produzindo efeitos na DECH de pele, enquanto altos níveis desta citocina e TNF-alfa correlacionam-se com o dano celular mais intenso (DICKINSON; SVILAND, 1991). O INF-gama pode mediar o desenvolvimento do processo patológico do trato gastrointestinal e pele durante a DECH (MOWAT, 1989). Devido à expressão de moléculas do MHC classe I e II reguladas pelo INF-gama, é possível que um aumento destas moléculas durante a DECH pode fazer células alvos no intestino e epitélio mais susceptíveis a lise pelas células T citotóxicas. O INF-gama parece mediar a supressão da proliferação de linfócitos na resposta a mitógenos e aloantígenos em vários sistemas de DECH experimental (KRENGER; FALZARANO *et al.*, 1996). A função imunossupressiva é mediada através de mecanismos, tais como indução de ON e interação Fas-FasL (REFAELI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2009; WELNIAK *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 1998). Assim, o INF-gama pode mostrar efeitos supressivos e estimulatórios em diferentes circunstâncias (BURMAN *et al.*, 2007).

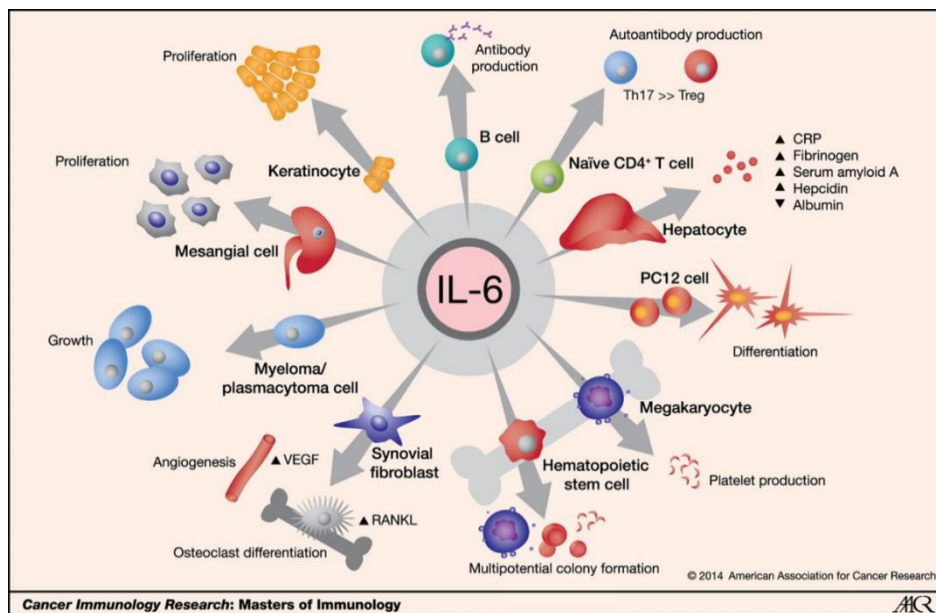
2.7.3.4 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma pequena glicoproteína humana composta por 184 aminoácidos com dois potenciais sítios de N-glicosilação e quatro resíduos de cisteínas. O tamanho da proteína do núcleo é de aproximadamente de 20kDa, e a glicosilação apresenta um tamanho de 21 a 26 kDa (SIMPSON *et al.*, 1997; TANAKA; KISHIMOTO, 2014). Foi descoberta em 1986 como um fator de diferenciação das células B, chamado BSF (fator estimulatório de célula B), cuja função é a ativação da célula B diferenciada em células produtoras de imunoglobulinas (HIRANO *et al.*, 1986).

É uma citocina pleiotrópica produzida por diversos tipos celulares (KISHIMOTO; AKIRA, 1995), como células T, células B ativadas, monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, adipócitos, células dendríticas, endoteliais, mesangiais, musculares, mesenquimais (AKIRA; TAGA; KISHIMOTO, 1993) e algumas células tumorais (MIHARA *et al.*, 2012). Isto representa uma ampla gama de efeito imune celular e humoral relacionado à inflamação, defesa do hospedeiro e danos teciduais. A IL-6 é conhecida pela diversidade de funções (figura 6), incluindo maturação e ativação das células B (HIRANO *et al.*, 1986), das células T (BETTELLI *et al.*, 2006), granulócitos (LIU *et al.*, 1997), macrófagos (NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2006) e hepatócitos (CRESSMAN *et al.*, 1996). Ela está diretamente envolvida em muitas doenças e processos inflamatórios (SERADA *et al.*, 2008) e estimula a resposta de fase aguda à infecção e dano, diferenciação, e/ou ativação de macrófagos (BARTON, 1997; KISHIMOTO; AKIRA, 1995). Conhecida como proteína pró-inflamatória, quando produzida pelas células dendríticas ativadas inibe a função de células T Regs (PASARE, 2003). A IL-6 possui um papel crítico na patofisiologia da DECH, sendo relevante na indução e severidade da doença (FUJII *et al.*, 2006; MIN *et al.*, 2001; SAKATA *et al.*, 2001; SYMINGTON *et al.*, 1992; TAWARA *et al.*, 2011; YASMINEH; KAUR;

BLAZAR, 1995), apresentando níveis muito elevados nestes pacientes (FERRÀ *et al.*, 1998; MIN *et al.*, 2001; PIHUSCH *et al.*, 2006; REMBERGER; RINGDÉN, 1997; SYMINGTON *et al.*, 1992). A IL-6 também está associada a uma série de condições adversas após o transplante, como infecções e mucosites (BLADON; TAYLOR, 2002; FUJII *et al.*, 2006; IMAMURA *et al.*, 1994; MIN *et al.*, 2001; KISHIMOTO; AKIRA, 1995; VISENTAINER *et al.*, 2003). Um pico alto dos níveis de IL-6 foi observado durante sintomas máximos em pacientes com DVO (REMBERGER; RINGDÉN, 1997; SCHOTS *et al.*, 2003) ou síndrome de DVO-like seguida de DECHa (SYMINGTON *et al.*, 1992), complicações pulmonares (REMBERGER; RINGDÉN, 1997; SCHOTS *et al.*, 2003; SYMINGTON *et al.*, 1992) e DECH hiperaguda (IMAMURA; HASHINO, 1994b).

Figura 6 — Atividade pleiotrópica da IL-6. Funções da IL-6 em diferentes tipos celulares e órgãos



Fonte: Tanaka & Kishimoto. *Cancer Immunology Research* 2014;2:288-294. (TANAKA; KISHIMOTO, 2014)

2.8 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MECANISMOS DA IL-6

2.8.1 Vias de sinalização da IL-6

A trajetória de sinalização da IL-6 inclui a ligação de duas moléculas da citocina a dois receptores específicos para IL-6 (IL-6R (gp80 ou CD126)) e duas glicoproteínas de superfície celular, chamada de gp130 (CD130), como um sinal de transdução (HIBI *et al.*, 1990). Os receptores da IL-6 podem ser de duas formas: ligado à membrana (mIL-6R) e na forma solúvel (sIL-6R). O receptor solúvel tem um curto domínio intracelular e depende da expressão da proteína de membrana celular gp130 para o sinal de transdução intracelular (SCHELLER; GARBERS; ROSE-JOHN, 2014). Quando a IL-6 transmite seu sinal através da ligação ao receptor de membrana (mIL-6R), está atuante a via clássica de sinalização ou cis-sinalização. Quando a sinalização é através do receptor solúvel (sIL-6R), atua a trans-sinalização (KIM *et al.*, 2015).

2.8.1.1 Receptores de membrana (Via clássica)

O complexo de sinalização da IL-6 é constituído da cadeia transmembrana de 80kDa, a IL-6R (mIL-6R); e uma glicoproteína de superfície celular de 130kDa (HIBI *et al.*, 1990). Esta é chamada de gp130 e apresenta um domínio transmembrana que é responsável pela transdução de sinal através da membrana celular (YAMASAKI; TAGA; HIRATA, 1988). A IL 6 exibe afinidade somente ao IL-6R, mas não ao gp130, conseqüentemente células que expressam apenas gp130 mas não o IL-6R não respondem a IL-6 (ROSE-JOHN; HEINRICH, 1994). A ligação do receptor de membrana é expressa somente por um número limitado de tipos celulares, que inclui células hematopoéticas, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células B ativadas, células T *naive*, megacariócitos, e células não hematopoéticas, como

hepatócitos e células epiteliais intestinais (ROSE-JOHN *et al.*, 2006; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2006; TANAKA; KISHIMOTO, 2014; WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014). Portanto nestas células a sinalização pode ser iniciada através do complexo associado à membrana da IL-6, IL-6R e gp130. Assim, ao contrário da expressão celular da gp130, o mIL-6R mostra um perfil altamente restrito de expressão. Já o gp130 é expresso onipresentemente em todos os tecidos, mesmo na falta de detecção da expressão do receptor mIL-6R (HIBI *et al.*, 1990). Isto sugere que o gp130 não é um componente somente do mIL-6R, mas funciona também como sinal de transdução para outras citocinas além da IL-6. Embora a IL-6R é um único receptor de ligação, a cadeia de transdução de sinal gp130 é compartilhada por outras citocinas membros da família da IL-6, que inclui o fator neurotrófico ciliar (*Ciliar Neurotrophic Fator*-CNTF), fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina M (OM), IL-11, e cardiotropina (CT)-1, todas usam gp130 como componente dos seus receptores (GEARING *et al.*, 1992; IP *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 2010; PENNICA *et al.*, 1995; TANAKA; KISHIMOTO, 2014). Este único sistema de receptor, compartilhado entre a gp130, ou seja, a interação entre múltiplos receptores e um sinal de transdução comum, pode explicar a atividade funcional redundante das citocinas, que é uma característica da IL-6 (KISHIMOTO, 2005, 2010; KISHIMOTO; AKIRA; TAGA, 1992).

Quando a IL-6 se liga ao IL-6R é induzida a homodimerização do gp130 e uma alta afinidade funcional do complexo: receptor da IL-6, IL-6R e gp130 é formada. A IL-6 e seu receptor interagem na forma de um complexo que consiste de duas moléculas de IL-6 e dois IL-6R e duas proteínas gp130 (Figura 7). A dimerização do gp130 leva à transdução de sinal (ROSE-JOHN; NEURATH, 2004). Este modo de sinalização da IL-6, com ativação de células via mIL-6R com o complexo IL-6 e gp130, caracteriza a via clássica de sinalização ou cis-sinalização (SCHROERS, 2005). Esta via frequentemente está associada com regeneração tecidual e propriedades anti-inflamatórias (SCHELLER; GARBERS; ROSE-JOHN, 2014).

2.8.1.2 Receptores solúveis (Trans-sinalização)

Receptores solúveis foram descritos em muitas citocinas e são reguladores importantes de eventos inflamatórios, por atuar como agonistas e antagonistas da sinalização dessas proteínas. A sIL-6R está presente em todos os tecidos e tipos celulares do corpo humano, no soro e fluidos teciduais (urina, fluido sinovial e fluido cérebro espinhal) (ROSE-JOHN *et al.*, 2006; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2006; TANAKA; KISHIMOTO, 2014; WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014). O receptor solúvel sIL-6R amplifica a sinalização mediada pela ativação de alguns tipos celulares, que expressam a proteína de sinal de transdução gp130, na falta da expressão do mL-6R (CHALARIS *et al.*, 2007; OBERG *et al.*, 2006; ROSE-JOHN *et al.*, 2007; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2006). A sIL-6R se liga a IL-6 com afinidade comparável a mL-6R e o complexo IL-6/sIL-6R atua, antagonisticamente, nas células que expressam gp130. Muitos receptores de citocinas solúveis inativam as citocinas pela interferência com a ligação do mL-6R, mas o receptor sIL-6R forma um complexo com a IL-6, ligando-se e ativando a gp130 apenas nas células que não expressam o mL-6R. Portanto, estas células, podem também apresentar uma capacidade de resposta a IL-6. A ativação das células que expressam somente o gp130 via IL-6/sIL-6R é chamada trans-sinalização (ROSE-JOHN; HEINRICH, 1994). Este modo de ativação parece ser importante em muitos dos efeitos pró-inflamatórios da IL-6 (SCHELLER *et al.*, 2011). A sIL-6 é formada principalmente através da clivagem proteolítica do mL-6R por desintegrinas e proteases como as metaloproteases (ADAM) 10 e 17 e em menor extensão por tradução a partir de um RNAm de *splicing* alternativo (DIMITROV *et al.*, 2006; ROSE-JOHN, 2015). Neste RNAm, o éxon que codifica para o domínio transmembrana do IL-6R é separado e a leitura é alterada, resultando na tradução de 10 aminoácidos adicionais no COOH terminal do sIL-6R (LUST *et al.*, 1992; ROSE-JOHN; HEINRICH, 1994). O receptor solúvel é liberado pelo fígado e pelas

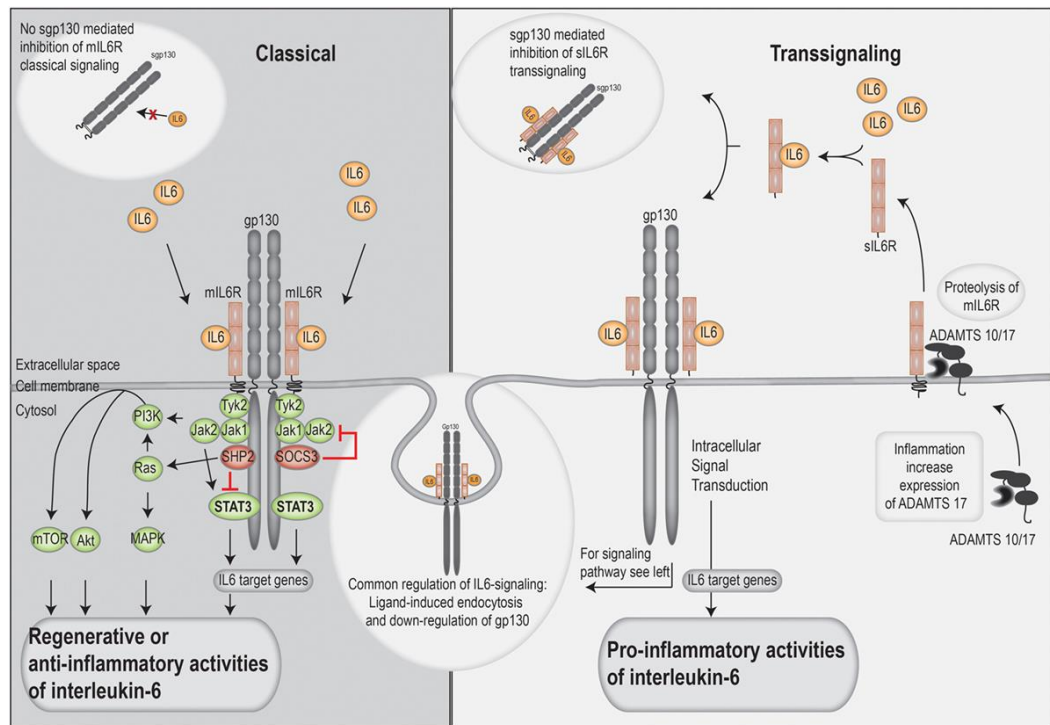
células hematopoéticas, mas a ativação da ADAM17, durante a inflamação, causa um rápido aumento local dos níveis de sIL-6R (TVEDT *et al.*, 2017). A sinalização clássica da IL-6 permanecerá intacta, pois a ligação da mIL-6R com a IL-6 não é afetada, enquanto a trans-sinalização da IL-6 está completa devido à ligação do complexo dimérico sIL-6R/gp130 (GARBERS *et al.*, 2018).

O gp130 também possui a forma solúvel (sgp130), que sob circunstâncias normais tem uma concentração molar duas vezes mais alta que o sIL-6R, talvez o gp130 atue como tampão fisiológico contra a trans-ativação da IL-6. A trans-sinalização da IL-6 é regulada por ambos, pela liberação da sIL-6R e níveis de sgp130 (JONES; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2011; TVEDT *et al.*, 2017).

2.8.1.3 Outra via de sinalização

Um terceiro modo de sinalização da IL-6 foi descrito recentemente, sendo denominado *cluster* IL-6 (HEINK *et al.*, 2017). Nesta via a IL-6 está localizada, no receptor como um processo intracelular, e depois disso, expressa na superfície das CAA enquanto o complexo estimula diretamente a gp130 nas células T pelo contato direto célula-célula (HEINK *et al.*, 2017).

Figura 7 — Via clássica e trans-sinalização da IL-6



Fonte: Tvedt *et al.* *Frontiers in Immunology* 2017; 8:1-15. (TVEDT *et al.*, 2017)

2.8.2 Regulação da expressão de IL-6

2.8.2.1 Ativação

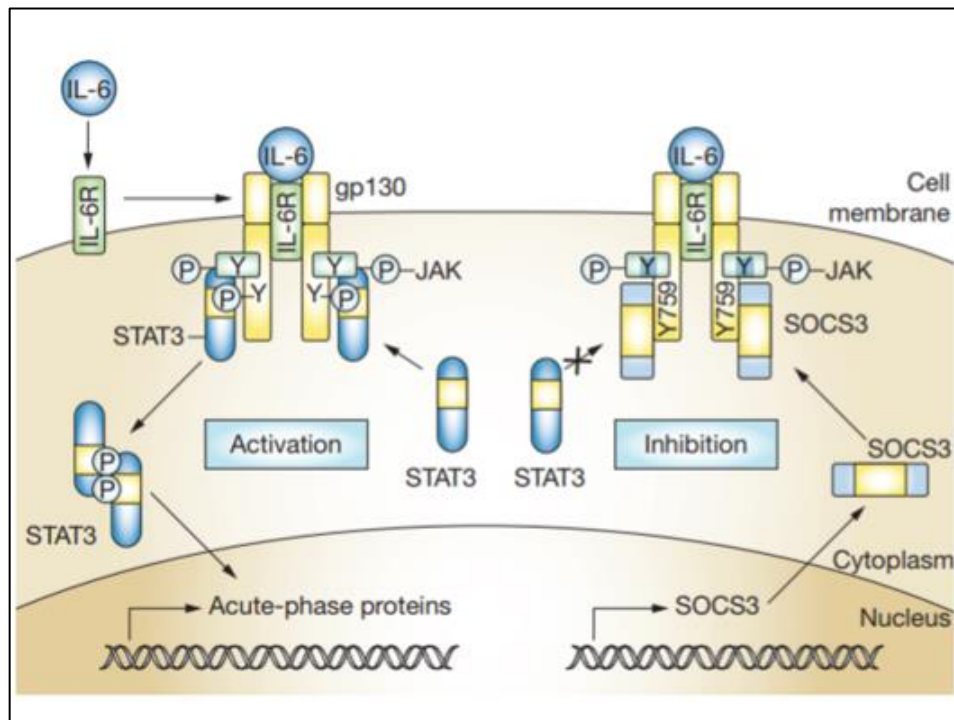
O estímulo da IL-6 induz a fosforilação de proteínas tirosinoquinasas intracitoplasmáticas. Ocorre pela formação do complexo de ligação da IL-6 ao seu receptor mIL-6R, com as duas moléculas de gp130. O gp130 não possui um domínio catalítico específico, e o seu mecanismo de ação ocorre através de moléculas catalíticas que estão associadas com os receptores de citocinas, *Janus Kinase* Ativado (JAK) e do ativador de transcrição (STAT) (DARNELL; KERR; STARK, 1994). A ativação do gp130 leva ao sinal de transdução, através da ativação da trajetória de sinalização JAK/STAT, diminuindo a via JAK levando a regulação dos fatores de transcrição STAT3 na célula alvo (KIM *et al.*, 2015). Com minutos de estímulo da IL-6, a JAK induz à fosforilação e recrutamento do STAT3, o qual forma um

dímero que é translocado para o núcleo e leva a expressão genética (KISHIMOTO, 2006, 2010).

2.8.2.2 Inibição

Embora as citocinas, tais como a IL-6, sejam essenciais para a vida, a sua superprodução frequentemente está envolvida em diversas doenças, portanto é essencial a existência de um mecanismo regulatório no sistema de sinalização. O sistema de sinalização da IL-6 é regulado por um sistema de *feedback* negativo, pelos supressores da sinalização de citocinas (SOCS) e inibidores de ativação da proteína STAT (PIAS). A interação IL6/IL-6R leva à ativação do STAT3, no qual as moléculas SOCS são um dos genes alvos da trajetória de sinalização JAK/STAT. A indução de vários passos do gene de resposta da IL-6 é contabilizada pela ativação do fator de transcrição STAT3, o qual também estimula a ativação do gene supressor de citocina que codifica a sinalização 1 (SOCS1) e SOCS3. Sobre estas condições, o SOCS1 se liga diretamente com a JAK tirosina fosforilada, e então inibe a sua atividade catalítica, enquanto o SOCS3 se liga a tirosina-fosforilada gp130 para terminar a sinalização pelo principal meio de *feedback* negativo, inibindo a sinalização de citocinas pela ligação ao complexo de receptores (NAKA *et al.*, 1997). O SOCS1 pode funcionar como um inibidor geral da trajetória de sinalização JAK/STAT através da inibição da atividade de tirosinoquinase da JAK (CHUNG *et al.*, 1997).

Figura 8 — Transdução de sinal da IL-6



Ativação, através do estímulo mediado pela IL-6 induz a homodimerização do gp130, ativando (fosforilando) JAK e STAT3. A ativação da STAT3 forma heterodímeros, o qual induz a ativação de vários genes. A Inibição ocorre através do SOCS1 que se liga diretamente na JAK e SOCS3 no gp130, impedindo a ativação do SOCS3.

Fonte: Nishimoto & Kishimoto. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2006;2:619-626. (NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2006)

2.8.3 Efeitos da IL-6

2.8.3.1 Efeito da IL-6 no processo pró-inflamatório

A IL-6 é uma citocina produzida em tecidos locais, e liberada na circulação em quase todas as situações de alteração homeostática, que inclui endotoxemia, pulmão endotóxico, trauma e infecção aguda (KISHIMOTO; AKIRA; TAGA, 1992). A IL-6 circulante adicionalmente a sua participação na geração de autoimunidade contra infecção intracelular crônica, junto com outras citocinas alarmantes como TNF-alfa e IL-1, é necessária para a indução de reações de fase aguda, constituída de febre, liberação de corticosterona, e

produção hepática de muitas proteínas que são inibidores de proteases (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

Durante a inflamação aguda os principais fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da expressão da IL-6; são NF-kB (fator nuclear kappa B), CEBP-alfa (*enhancer binding protein alpha*) e AP-1 (proteína ativadora 1) (BEETZ *et al.*, 2000; HUNGNESS *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2011). Estes são ativados pelo TNF-alfa, IL-1beta, receptor *toll-like*, prostaglandinas e adipócitos. A principal origem da IL-6 na inflamação aguda são os macrófagos e monócitos, enquanto que as células T são as maiores contribuidoras durante a inflamação crônica (NAUGLER; KARIN, 2008).

A IL-6 estimula o hepatócito a produzir proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa (PCR), amiloidose A do soro (AAS), fibrinogênio, hepcidina e alfa-1, antiqumiotripsina e reduz a produção de fibronectina, albumina e transferrina (KISHIMOTO, 2006). O aumento dos níveis dessas proteínas, com a síntese regulada pela IL-6, é uma emergência ao sinal de estresse e contribui para a defesa do hospedeiro (TANAKA; KISHIMOTO, 2014).

2.8.3.2 Efeito da IL-6 no processo anti-inflamatório

Não há dúvida em relação à natureza pró-inflamatória do TNF-alfa e IL-1, mas não está claro se a IL-6 é apenas uma citocina indutora de reação de fase aguda ou se tem atividades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias neste processo. O uso farmacológico de IL-6 induz a liberação de moléculas anti-inflamatórias antagonistas como o receptor de IL-1 e o receptor TNF-alfa solúvel em indivíduos normais (TILG *et al.*, 1994).

A IL-6 inibe a resposta de citocinas pró-inflamatórias e neutrofilia nos tecidos e aumenta a liberação de moléculas anti-inflamatórias, como os inibidores de proteases (XING

et al., 1998). A liberação de proteínas de fase aguda como corticosterona, cujo papel é a inibição da inflamação local, uma das maiores características da reação de fase aguda, também é mediada pela IL-6.

Na resposta inflamatória provocada, tipicamente, por agentes de estresse não imune, tais como, endotoxinas, trauma e infecção, com indução de reação de fase aguda (FATTORI, 1994; KOPF *et al.*, 1994; RUZEK *et al.*, 1997), ocorre a inibição de citocinas pró-inflamatórias, e talvez ocorra a indução de moléculas anti-inflamatórias e inibidores de protease extra-hepática (LOTZ; GUERNE, 1991; TILG *et al.*, 1994). Portanto, a IL-6 comanda o controle da extensão da resposta inflamatória tecidual.

2.8.3.3 Efeito da IL-6 nas células imunocompetentes

A IL-6 apresenta um efeito direto e indireto, nas células imunocompetentes, que participam no desenvolvimento da DECH. É essencial para a maturação, proliferação, diferenciação e manutenção das células B e células plasmáticas e vários subtipos de células T pró-inflamatórias.

Sobre a ativação das CAAs, a célula precursora T helper *naive* (Th0) pode se diferenciar em Th1, Th2 ou Th17 e células T Regs (Figura 9). A IL-6 parece contribuir no estímulo do desenvolvimento das células Th2 e Th17 que são altamente pró-inflamatórias e na inibição do desenvolvimento das células T Regs.

A diferenciação das células T CD4+ *naive* em células Th2 é controlada pela indução da expressão da IL-4 e pela supressão da sinalização do INF-gama (DIEHL; RINCÓN, 2002; SOFI *et al.*, 2009). Estudos mostram que a diferenciação em células Th17, ocorre devido ao coestímulo da IL-6 e do TGF-beta, essencial para esta diferenciação (BETTELLI *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006). A IL-6 pode inibir fortemente o TGF-beta que media a diferenciação

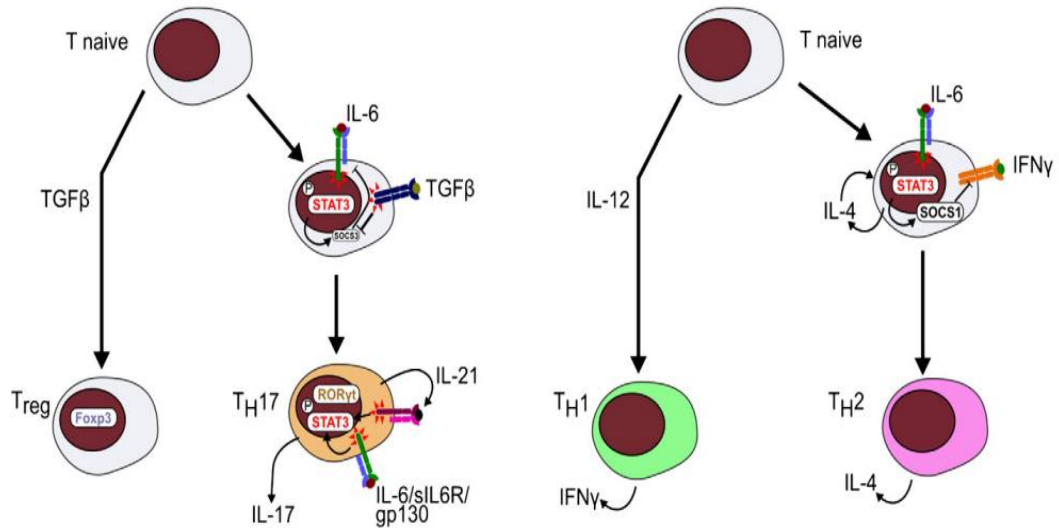
das células T CD4+ *naive* nas células T Regs, as quais inibem a autoimunidade e protegem contra a lesão tecidual. Isto mostra que a IL-6 é uma citocina chave envolvida na diferenciação da célula T (BETTELLI *et al.*, 2006; VELDHOEN *et al.*, 2006).

Células efectoras Th17, eliminam o patógeno extracelular do hospedeiro, e a IL-6 induz o domínio das células Th17 sobre a célula T Reg que pode ocorrer para a perturbação da tolerância imune, envolvida no desenvolvimento das doenças autoimunes e inflamatórias (HIRANO, 2010; SAKAGUCHI, 2000).

Foi mostrado que a combinação de IL6/sIL-6R leva à supressão das células T Regs e a indução das células Th17, indicando que a IL-6 tem um papel importante na diferenciação da célula T no processo de trans-sinalização (DOMINITZKI; FANTINI, 2007).

Outro aspecto importante, é que a sinalização da IL-6 é crucial para o tráfico de células imunes para o tecido inflamado e órgãos linfoides. Isto é causado pela expressão alterada de moléculas de adesão pelas células endoteliais e expressão de seus ligantes pelas células imunocompetentes. A IL-6 também tem uma função importante, nos órgãos alvos da DECH, e pode ser um risco de lesão durante a DECH, induzindo a doença pela combinação dos seguintes fatores: dano imune-mediado e toxicidade farmacológica (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Figura 9 — Diferenciação das células T *naive* em células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias



Fonte: Scheller *et al.* Biochimica et Biophysica Acta 2011;1813: 878–888. (SCHELLER *et al.*, 2011)

2.8.3.4 Regulação da CTH e regeneração tecidual

A IL-6 é importante para a regeneração tecidual e da CTH em vários órgãos. Isto foi demonstrado na hematopoese, células do fígado, mucosa GI e células musculares. O aumento da sua função nestes órgãos está associado com a regeneração e a desregulação da citocina, após a lesão durante a inflamação crônica pode contribuir para a disfunção do órgão (TVEDT *et al.*, 2017). Na hematopoese, a IL-6 induz a maturação de megacariócitos em plaquetas e ativação da *stem cell* (ISHIBASHI *et al.*, 1989). Na medula óssea, a IL-6 ativa osteoclastos, levando à reabsorção óssea e osteoporose (KOTAKE *et al.*, 2009).

2.8.3.5 Efeito neurológico da IL-6

É múltipla a origem celular da IL-6 dentro do sistema nervoso central (SNC), incluindo neurônios, astrócitos e células micróglia de diferentes regiões do cérebro. Sob condições fisiológicas, os transcritos IL-6 e IL-6R são expressos em subpopulações neuronais

específicas, por exemplo, célula granular do cerebelo, giro denteado e bulbo olfatório, nas células piramidais do hipocampo e, neurônios do hipotálamo e córtex. A distribuição dos transcritos da IL-6 e IL-6R, no sistema nervoso intacto, sugere um papel fisiológico da IL-6. Acredita-se que o número de moléculas gp130, sob condições fisiológicas, é relativamente constante em todos os tipos celulares (HIBI *et al.*, 1990), incluindo células neurais. Embora muitos neurônios expressem IL-6, muitos deles falham ao responder a citocina. Isto deve-se a disponibilidade limitada do IL-6R que pode ser superado pela adição da sIL-6R (MÄRZ *et al.*, 1997).

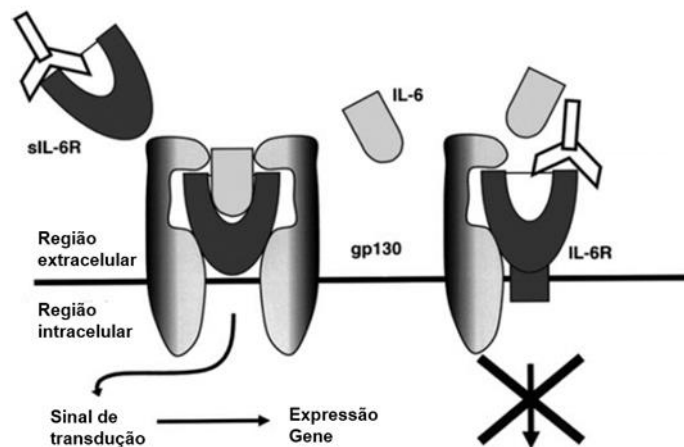
Os receptores solúveis para fatores de crescimento ou citocinas podem ter atividade agonista ou antagonista. Além disso, a geração de moléculas de adesão solúveis por ação de proteases pode levar a alterações no contato célula-célula que pode ter um efeito na comunicação intercelular e/ou integridade da barreira hematoencefálica. Por isso, é fundamental a identificação da origem celular do sIL-6R e o entendimento do mecanismo e da regulação da geração de proteínas e desses receptores, no SNC. Nas células do SNC, as citocinas podem exigir a presença de um receptor solúvel que leva ao desenvolvimento de citocinas com aumento drástico da atividade biológica (MÄRZ; OTTEN; ROSE-JOHN, 1999). Assim, a IL-6 é um elemento principal, no sistema nervoso, como é evidente o seu envolvimento na neuroinflamação, processo neurotrópico e várias patologias do SNC (SPOOREN *et al.*, 2011).

2.8.4 Bloqueador da IL-6

O tocilizumab é um anticorpo monoclonal anti IL-6R humanizado, da classe de imunoglobulina G1 (IgG1), o qual é gerado pela região complementária determinante do enxerto de um anticorpo de camundongo anti-humano IL-6R para IgG1 humana (SATO *et al.*,

1993). O tocilizumab pode bloquear o sinal de transdução que media a IL-6 pela inibição da ligação da IL-6 pelo mIL-6R e sIL-6R (Figura 10) (SATO *et al.*, 1993). Este bloqueio da IL-6 apresenta um efeito terapêutico em muitas doenças humanas, como na artrite reumatoide, doença de Castleman e artrite idiopática juvenil (NISHIMOTO *et al.*, 2005; OLDFIELD; DHILLON; PLOSKER, 2009; YOKOTA *et al.*, 2008). Estudos sugerem fortemente que o bloqueio da IL-6 pode ser uma terapêutica promissora para várias doenças autoimunes refratárias, inflamatórias e câncer (TANAKA; KISHIMOTO, 2014). A elevação dos níveis de IL-6 após o TCTHa pode ser controlada por terapias com o receptor anti-IL6 (IL-6R). A administração do bloqueador na DECHA, em modelos animais, induzem ao aumento das células T Regs, que apresentam papel protetor (CHEN *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, diminuição da mortalidade (CHEN *et al.*, 2009; TAWARA *et al.*, 2011).

Figura 10 — Bloqueio da sinalização da IL-6 pelo anticorpo anti-IL-6R



Legenda: O bloqueador se liga ao receptor da IL-6 de membrana (mIL-6R) e solúvel (sIL-6R).

Fonte: Kishimoto. *Arthritis Research & Therapy* 2006; 8 (Suppl 2):S2. (KISHIMOTO, 2006)

Diante do que foi apresentado, considerando a elevada incidência e a dificuldade no diagnóstico da DECH, nos pacientes submetidos ao TCTH-alo, o estudo de novos testes laboratoriais identificados como biomarcadores, como o estudo da cinética da IL-6 ao longo do transplante e dos polimorfismos nos genes produtores de citocinas, poderão beneficiar os pacientes e servir como preditores de prognóstico em crianças e adultos.

3 JUSTIFICATIVA

O TCTH é uma modalidade terapêutica de grande utilidade em diversas doenças hematológicas, imunológicas e genéticas. Apesar dos avanços ocorridos, nos últimos anos, em diversos aspectos do transplante a taxa de mortalidade decorrente de complicações pós-transplante é muito elevada, principalmente em decorrência da DECHa. Sabe-se que o polimorfismo nos genes produtores de citocinas e o nível sanguíneo destas, apresentam um importante papel na biologia da DECH e, conseqüentemente, na incidência, severidade da doença e na sobrevida dos pacientes. A população brasileira possui etnia mista e há poucos estudos sobre os polimorfismos nos genes das citocinas na nossa população. A identificação dos níveis da IL-6 e dos polimorfismos dos genes pode ser útil como novos testes laboratoriais, rápidos e não invasivos que poderão trazer benefícios aos pacientes com impacto no prognóstico e na conduta terapêutica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação dos polimorfismos nos genes do *INF- γ* , *TNF- α* , *IL-6*, *IL-10* e dos níveis de *IL-6* na incidência, severidade de DECHa e na sobrevida de pacientes submetidos ao TCTH-alo. Identificando assim, biomarcadores, que poderão ser utilizados como determinantes do prognóstico, regime profilático e indicadores de terapias alvo em pacientes submetidos ao TCTH-alo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as frequências dos polimorfismos *INF- γ +874*, *TNF- α -238 e 308*, *IL-10 -1082, -819 e -592* de receptores e doadores.
2. Associar os genótipos da *IL-6* na posição -174 com os níveis de *IL-6* plasmática na população pediátrica e adulta submetida ao TCTH-alo.
3. Verificar a associação da *IL-6* com outras variáveis, como tipo de regime de condicionamento, uso de antitumoglobulina, febre, PCR e óbito.
4. Associar os níveis de *IL-6* plasmática em pacientes haploidênticos com a DECH aguda e a síndrome de liberação de citocinas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo de coorte, no período de abril de 2015 a abril de 2018, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.2 CAMPO DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Unidade de Diagnóstico Especializado do Serviço de Diagnóstico Laboratorial, Unidade de Análise Molecular e de Proteínas, Serviço de Hematologia e Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população consiste de pacientes internados, crianças e adultos, na Unidade de Transplante de Medula Óssea, submetidos ao TCTH-alo. Foram utilizadas amostras de sangue periférico ou medula óssea, coletadas com K₂EDTA, após a realização dos exames de rotina pela Assistência. Os níveis plasmáticos da IL-6 foram medidos por citometria de fluxo em diferentes períodos: antes do transplante e pós-transplante nos dias 7, 14, 28, 60 e 100. O grau da DECH classificado de acordo com os critérios padronizados (GLUCKSBERG *et al.*, 1974). Foram genotipadas as amostras de sangue periférico ou medula óssea do receptor e doador antes do TCTH.

5.3.1 Cálculo amostral

Considerando que em torno de 60% dos pacientes submetidos ao transplante alogênico apresentam DECH após o procedimento e 30% evoluirão a óbito (GOUSSETIS *et al.*, 2011), para atingir um poder de 80% e considerando o nível de significância (α) de 0.05, são necessários, no mínimo 98 pacientes.

5.4 METODOLOGIA

5.4.1 Dosagem de citocinas

A concentração de IL-6, no plasma, foi identificada por citometria de fluxo usando o kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) assay Human soluble Protein Flex Set* (BD Biosciences, San Diego, CA). O procedimento analítico foi realizado, conforme as instruções do fabricante. As amostras de plasma foram incubadas com *beads* de captura de citocinas e com seu respectivo anticorpo conjugado de detecção em temperatura ambiente e protegido da luz. Após esses procedimentos, as amostras foram lavadas e a aquisição foi realizado no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). A curva padrão foi feita com o software *BD CBA Analysis Software FCAP Array™ 3.0* (BD Biosciences, San Diego, CA) com R2 maior que 0,99 e os resultados foram obtidos a partir da equação logística.

5.4.2 Análise molecular

Amostras de medula óssea ou sangue periférico, coletadas com K₂EDTA, foram obtidas de pacientes e doadores antes do TCTH. O DNA foi extraído utilizando o *iPrep purelink™ gDNA blood kit* no equipamento *iPrep™ Purification Instrument* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA). Os DNAs foram quantificados no equipamento *Nanodrop*

1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA), após foi diluído para obter uma concentração de 20mM e congelado a -80°C para posterior reação. Foram utilizados *primers* customizados para a identificação dos polimorfismos na região promotora dos genes das citocinas, da *IL-6* -174 G/C (rs1800795); *INF-γ*+874 T/A (rs2430561); *TNF-α* -308 A/G (rs1800629), -238 A/G (rs361525); *IL-10* -1082 A/G (rs1800896), -819 C/T (rs1800871) e -592 A/C (rs1800872). O ensaio de discriminação alélica for realizado por PCR em Tempo Real no equipamento *Step One™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e analisados no *Step One software* v 2.3.

5.4.3 Exames bioquímicos

A dosagem de PCR foi determinada, quantitativamente, por técnica de imunoturbidimetria usando o analisador modular COBAS 8000 (Roche, Indianopolis, US). Considerando-se alterados valores de PCR acima de 5mg/dL.

5.4.4 Outros exames laboratoriais

A cultura do sangue dos pacientes foi realizada no BacT/ALERT 3D Food® (Biomérieux, St. Laurent, Quebec, Canadá), no qual duas culturas de dois sítios diferentes foram observadas por cinco dias de incubação. Foi utilizado método clássico ou VITEK 2 para identificação e testes de sensibilidade realizados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS, 2003).

5.5 ANÁLISE DOS DADOS

As frequências alélicas foram calculadas por contagem gênica e os desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foram analisados usando χ^2 testes. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os grupos (com ou sem GVHD) dos indivíduos usando χ^2 testes. Além disso, também comparamos genótipos agrupados em diferentes modelos de herança (aditivos, recessivos e dominantes) entre amostras (MINELLI *et al.*, 2005; ZINTZARAS; LAU, 2008). Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS vs 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Mediana, percentis P25 e P75 foram utilizados para a análise descritiva dos dados. Para a associação da IL-6 com as demais variáveis e períodos foi utilizado o modelo de equações de estimativas generalizadas (GEE), modelo linear generalizado (GLM), teste de Bonferroni e comparação aos pares. A Sobrevida global (SG) foi definida pelo tempo da infusão das células tronco hematopoéticas (CTH) ao óbito; sobrevida livre de DECH (SLDech) foi determinada desde a infusão das CTH ao primeiro episódio de DECHa e Sobrevida livre de doença (SLD) foi determinada pelo tempo desde a infusão de CTH até a recaída da doença. SG, SLDech e SLD foram calculadas usando o método de *Kaplan-Meier* e diferenças na função de distribuição entre tempo e evento foram comparadas pelo teste de log-rank. Os haplótipos construídos com a combinação dos três polimorfismos da IL-10 e suas frequências foram inferidos utilizando o programa PHASE 2.0 (MINELLI *et al.*, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A. K; ANDREW, H. H.; LICHTMAN A. H., PILLAI. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 9th. Philadelphia: Elsevier, 2017.
- ABRAHAM, L. J.; FRENCH, M. A.; DAWKINS, R. L. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 92, n. 1, p. 14–18, 1993.
- AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Cell stimulatory. **Advances in Immunology**, v. 54, p. 1–78, 1993.
- AMBRUZOVA, Z. *et al.* Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 44, n. 4, p. 227–235, Aug. 2009.
- ANTIN, J. H. *et al.* Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 80, n. 12, p. 2964–2968, 2014.
- APPELBAUM, F. R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 385–389, 2001.
- APPELBAUM, F. R. Hematopoietic-cell transplantation at 50. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 15, p. 1472–1475, 2007.
- APPERLEY, J. F. *et al.* Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. **British Journal of Haematology**, v. 69, n. 2, p. 239–245, 1988.
- APPLEMAN, L. J.; BOUSSIOTIS, V. A. T cell anergy and costimulation. **Immunological Reviews**, v. 192, p. 161–180, 2003.
- AZARPIRA, N. *et al.* Interleukin-10 gene polymorphism in bone marrow transplant recipients. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 6, n. 1, p. 74–79, 2008.
- BACIGALUPO, A. *et al.* Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 12, p. 1628–1633, 2009.
- BAKER, M. B. *et al.* The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, p. 2645–2656, 1996.
- BALL, L. M.; EGELER, R. M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. **Bone Marrow Transplantation**, v. 41, p. S58–S64, 2008.
- BARNES, D. W. H. *et al.* Treatment of murine leukaemia with x rays and homologous bone marrow. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4993, p. 626, 1956.
- BARTON, B. E. IL-6: Insights into novel biological activities. **Clinical Immunology and**

Immunopathology, v. 85, n. 1, p. 16–20, 1997.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p. 74–80, 1994.

BEELEN, B. D. W. *et al.* Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole. **Blood**, v. 93, n. 10, p. 3267–3275, 1999.

BEETZ, A. *et al.* NF-kappaB and AP-1 are responsible for inducibility of the IL-6 promoter by ionizing radiation in HeLa cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 76, n. 11, p. 1443–1453, 2000.

BEILHACK, A. *et al.* In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 1113–1122, 2005.

BENNERMO, M. *et al.* Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: Implications for a variety of major diseases? **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2136–2140, 2004.

BERES, A. J.; DROBYSKI, W. R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUN, p. 1–9, 2013.

BERLINGERIO, M. *et al.* Mining clinical, immunological, and genetic data of solid organ transplantation. **Biomedical Data and Applications**, v. 224, p. 211–236, 2009.

BERTINETTO, F. E. *et al.* Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 5, p. 375–384, 2006.

BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BHANOORI, M. *et al.* The interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism is not associated with endometriosis in South Indian women. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 0–4, 2005.

BILLINGHAM, R. The biology of graft-versus-host reactions. **Harvey Lect**, v. 62, p. 21–78, 1966.

BLADON, J.; TAYLOR, P. Extracorporeal photopheresis reduces the number of mononuclear cells that produce pro-inflammatory cytokines, when tested ex-vivo. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 17, n. 4, p. 177–182, 2002.

BLAZAR, B. R. *et al.* Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN- γ -dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1272–1277, 2003.

BLAZAR, B. R.; MURPHY, W. J.; ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 6, p. 443–458, 2012.

- BLEAKLEY, M.; RIDDELL, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 371–380, 2004.
- BODMER, J. G. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. **Human Immunology**, v. 43, p. 149–164, 1995.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.
- BOGUNIA-KUBIK, K.; POLAK, M.; LANGE, A. TNF polymorphisms are associated with toxic but not with aGVHD complications in the recipients of allogeneic sibling haematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, n. 6, p. 617–622, 2003.
- BOISSET, J. C.; ROBIN, C. On the origin of hematopoietic stem cells: Progress and controversy. **Stem Cell Research**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2012.
- BORNHÄUSER, M. *et al.* Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 820–826, 2003.
- BRADLEY, M. B.; CAIRO, M. S. Cord blood immunology and stem cell transplantation. **Human Immunology**, v. 66, n. 5, p. 431–446, 2005.
- BRAY, R. A. *et al.* National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 14, n. 9 SUPPL., p. 45–53, 2008.
- BRINKMAN, B. M. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-308 gene variants in relation to major histocompatibility complex alleles and Felty's syndrome. **Human Immunology**, v. 41, n. 4, p. 259–266, 1994.
- BRIONES, J.; NOVELLI, S.; SIERRA, J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. **Bone Marrow Research**, v. 2011, p. 976793, 2011.
- BROCHSTEIN, A. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation after hyperfractionated total-body irradiation and cyclophosphamide in children with acute leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 1628–1624, 1987.
- BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. **American Journal of Pathology**, v. 169, n. 2, p. 338–346, 2006.
- BUEGER, M. D. E. *et al.* Tissue distribution of human minor histocompatibility ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens ' restricted Ag HA-1 and HA-2 were demonstrated on determined. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 5, p. 1788–1794, 1992.
- BURMAN, A. C. *et al.* IFN γ differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 1064–1072, 2007.
- BUSHLEY, A. W. *et al.* Polymorphisms of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and IL-18

and the risk of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 95, n. 3, p. 672–679, 2004.

CAHN, J. *et al.* Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems : a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) pro. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1495–1500, 2005.

CALVO, J. *et al.* Allelic frequencies of polymorphic variants of cytokine genes (IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL10, IL12p40, and IFNG) in a Spanish population. **Immunologia**, v. 21, p. 76–86, 2002.

CARLSON, M. J. *et al.* In vitro – differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. **Blood**, v. 113, n. 6, p. 1365–1374, 2009.

CAVET, J. *et al.* Interferon-g and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**, v. 98, p. 1–12, 2001.

CAVET, J. *et al.* Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3941–3946, 1999.

CAVET, J. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1594–1600, 2001.

CHAKRAVERTY, R. *et al.* An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 8, p. 2021–2031, 2006.

CHALARIS, A. *et al.* Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 1748–1755, 2007.

CHAMPLIN, R. *et al.* Harnessing graft-versus-malignancy: Non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. **British Journal of Haematology**, v. 111, n. 1, p. 18–29, 2000.

CHANG, D. *et al.* Rheumatology/immunology/allergy. **Immunological Investigations**, v. 28, n. 1, p. 77–86, 1999.

CHEN, X. *et al.* Absence of regulatory T-cell control of TH 1 and TH 17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3804–3813, 2007.

CHEN, X. *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T cell reconstitution and attenuates the severity of graft versus host disease. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 891–901, 2009.

CHEN, Y. B.; CUTLER, C. S. Biomarkers for acute GVHD: Can we predict the unpredictable. **Bone Marrow Transplantation**, v. 48, n. 6, p. 755–760, 2013.

CHICHEPORTICHE, Y. *et al.* TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32401–32410, 1997.

CHIK, K. W. *et al.* Elevated serum interleukin-15 level in acute graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, n. 12, p. 960–964, 2003.

CHINNAIYAN, A. M. *et al.* Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. **Science**, v. 274, n. 5289, p. 990–992, 1996.

CHOI, S.; LEVINE, J. E.; FERRARA, J. L. M. Pathogenesis and management of graft versus host disease. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 70, n. 1, p. 75–101, 2010.

CHOI, S. W. *et al.* The use of laparoscopic liver biopsies in pediatric patients with hepatic dysfunction following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 36, n. 10, p. 891–896, 2005.

CHUNG, B. *et al.* Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1601–1606, 2001.

CHUNG, C. D. *et al.* Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science**, v. 278, n. 5344, p. 1803–1805, 1997.

CLARK, J. G. *et al.* Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 6_pt_1, p. 1601–1606, 1993.

CLIFT, R. A. *et al.* Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. **Blood**, v. 76, n. 9, p. 1867–1871, 1990.

COBBOLD, S.; MARTIN, G.; WALDMANN, H. Monoclonal antibodies for the prevention of graft-versus-host disease and marrow graft rejection. The depletion of T cell subsets in vitro and in vivo. **Transplantation**, v. 42, n. 3, p. 239–247, 1986.

COLLADO-ESCOBAR, M.D. *et al.* Interleukin 6 gene promoter polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis. **The Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 6, p. 1461–1463, 2000.

CORTHAY, A. How do regulatory t cells work? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 4, p. 326–336, 2009.

COURIEL, D. *et al.* Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations and management. **Cancer**, v. 101, n. 9, p. 1936–1946, 2004.

COX, E. D. *et al.* Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. **Transplantation**, v. 72, p. 720–726, 2001.

CRAWLEY, E. *et al.* Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5'-flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes

- of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 6, p. 1101–1108, 1999.
- CRESSMAN, D. E. *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1379–1383, 1996.
- CUTLER, B. C. *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after transplantation : a meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 16, p. 3685–3691, 2001.
- D'ANDREA, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma, - production by suppressing natural killer cell stimulatory factor / IL-12 synthesis in accessory cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. September, p. 1041–1048, 1993.
- DARMSTADT, G. L. *et al.* Clinical, laboratory, and histopathologic indicators of the development of progressive acute graft-versus-host disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, n. 4, p. 397–402, 1992.
- DARNELL, J. E. J.; KERR, I. M.; STARK, G. R. JAK-STAT pathways and transcriptional activation to IFNs response and other transcriptional activation in extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 1994.
- DE CAPEI, M. U. *et al.* Genotyping for cytokine polymorphisms: Allele frequencies in the Italian population. **European Journal of Immunogenetics**, v. 30, n. 1, p. 5–10, 2003.
- DE WAAL MALEFYT, R. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1991.
- DEN HAAN, J. M. M. *et al.* Identification of a GVH disease-associated human minor histocompatibility antigen. **Science**, v. In press, n. 268, p. 1476–1480, 1995.
- DICKINSON, A. M. *et al.* Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. **British Journal of Haematology**, v. 127, n. 5, p. 479–490, 2004.
- DICKINSON, A. M.; CHARRON, D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 5, p. 517–525, 2005.
- DICKINSON, A. M. *et al.* Demonstration of direct involvement of cytokines in graft-versus-host reactions using an in vitro human skin explant model. **Bone Marrow Transplantation**, v. 7, n. 3, p. 209–216, 1991.
- DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 9, p. 531–536, 2002.
- DIMITROV, S. *et al.* Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 12, p. 2174–2176, 2006.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1627–1652, 1991.
- DOMINITZKI, S. *et al.* Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the

induction of FOXP3 in naive CD4+CD25- T cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2041–2045, 2007.

DONG, C. *et al.* ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. **Nature**, v. 409, n. 6816, p. 97–101, 2001.

DUFFNER, U. A. *et al.* Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7393–7398, 2004.

DUFOUR, J. H. *et al.* IFN- γ -Inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3195–3204, 2002.

EAPEN, M. *et al.* Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1947–1954, 2007.

EISSNER, G. *et al.* Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. **Blood**, v. 86, n. 11, p. 4184–4193, 1995.

ESKDALE, J. *et al.* Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9465–9470, 1998.

FALZARANO, G. *et al.* Suppression of B-cell proliferation to lipopolysaccharide is mediated through induction of the nitric oxide pathway by tumor necrosis factor-alpha in mice with acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2853–2860, 1996.

FATTORI, E. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1243–1250, 1994.

FERRÀ, C. *et al.* IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. **Haematologica**, v. 83, n. 12, p. 1881–1887, 1998.

FERRARA, J.L. Pathophysiology of graft-versus-host disease. **Seminars in Hematology**, v. 43, n. 1, p. 3–10, 2006.

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

FERRARA, J. L. *et al.* The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. **Stem Cells**, v. 14, n. 5, p. 473–489, 1996.

FERRARA, J. L. M. Cytokines and cellular effectors phase one: host tissue damage. **Journal of Hemotherapy**, v. 306, p. 299–306, 2000.

FERRARA, J. L. M. Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host-disease. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 20, n. 1, p. 91–97, 2007.

FERRARA, J. L. M.; LEVY, R.; CHAO, N. J. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-

vs.-host disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 5, n. 6, p. 347–356, 1999.

FERRARA, L. M. Plasma biomarkers in GVHD : a new era ? **Biology of Blood Marrow and Transplantation**, v. 15, n. 1, p. 33–38, 2009.

FILIPOVICH, A. H. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, n. 12, p. 945–956, 2005.

FISHMAN, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369–1376, 1998.

FLOMENBERG, N. *et al.* Impact of HLA class I and class II high resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome. **Blood**, v. 104, n. 0006–4971, p. 1923–1931, 2004.

FLOWERS, M. E. *et al.* Previous donor pregnancy as a risk factor for acute graft-versus-host disease in patients with aplastic anaemia treated by allogeneic marrow transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 74, n. 4, p. 492–496, 1990.

FLOWERS, M. E. D. *et al.* Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. **Blood Journal**, v. 117, n. 11, p. 3214–3219, 2011.

FRUCHT, D. M. *et al.* IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, p. 556–560, 2001.

FU, J.; HEINRICHS, J.; YU, X.-Z. Helper T-cell differentiation in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 4, p. 277–301, 2014.

FUJII, N. *et al.* Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, n. 5, p. 881–885, 2006.

GALE, R. P. *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology**, v. 67, n. 4, p. 397–406, 1987.

GAN, G. G. G. *et al.* Influence of genetic polymorphisms of cytokine genes in the outcome of HLA-matched allogeneic stem cell transplantation in a South East Asian population. **Cytokine**, v. 78, p. 55–61, 2016.

GARBERS, C. *et al.* Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 6, p. 395–412, 2018.

GARDERET, L. *et al.* The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of

- a polyclonal and naive but completely formed repertoire. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 340–346, 1998.
- GARTLAN, K. H. *et al.* Tc17 cells are a proinflammatory, plastic lineage of pathogenic CD8+T cells that induce GVHD without antileukemic effects. **Blood**, v. 126, n. 13, p. 1609–1620, 2015.
- GATTI, R. *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **The Lancet**, v. 292, n. 7583, p. 1366–1369, 1968.
- GEARING, D. P. *et al.* The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. **Science**, v. 255, n. 5050, p. 1434–1437, 1992.
- GHAYUR, T. *et al.* Graft-versus-host reactions in the beige mouse. An investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. **Transplantation**, v. 44, n. 2, p. 261–267, 1987.
- GILLIAM, A. C. *et al.* Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell injury in acute experimental graft-versus-host disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 3, p. 377–383, 1996.
- GIRALT, S. *et al.* Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 3, p. 367–369, 2009.
- GLUCKMAN, E. *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 6, p. 373–381, 1997.
- GLUCKSBERG, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. **Transplantation**, v. 18, n. 4; p. 295–304, 1974.
- GOKER, H.; HAZNEDAROGLU, I. C.; CHAO, N. J. Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 3, p. 259–277, 2001.
- GORODEZKY, C. *et al.* The genetic structure of Mexican mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. **Human Immunology**, v. 62, n. 9, p. 979–991, 2001.
- GOULMY, E. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 281–285, 1996.
- GOUSSETIS, E. *et al.* Cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease in children after matched sibling hematopoietic stem cell transplantation: A single-center experience. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 8, n. 3, p. 276–280, May 2011.
- GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, 2005.
- GREWAL, S. S. *et al.* Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or

umbilical cord blood? **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4233–4244, 2003.

GROGAN, J. L. *et al.* Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. **Immunity**, v. 14, n. 3, p. 205–215, 2001.

GYURKOCZA, B.; SANDMAIER, B. M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. **Blood**, v. 124, n. 3, p. 344–353, 2014.

HAHN, T. *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5728–5734, 2008.

HALVERSTADT, A. *et al.* Interleukin-6 genotype is associated with high-density lipoprotein cholesterol responses to exercise training. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1734, n. 2, p. 143–151, 2005.

HARRIS, A. C. *et al.* International, multi-center standardization of acute graft-versus-host disease clinical data collection: e report from the MAGIC consortium. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 1, p. 4–10, 2016.

HARRIS, A. C.; FERRARA, J. L. M.; LEVINE, J. E. Advances in predicting acute GVHD. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 3, p. 288–302, 2013.

HATTORI, K. *et al.* Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. **Blood**, v. 91, n. 11, p. 4051–4055, 1998.

HATZIMICHAEL, E.; TUTHILL, M. Hematopoietic stem cell transplantation. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 3, n. 1, p. 105–117, 2010.

HEINK, S. *et al.* Trans - presentation of IL - 6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T H 17 cells. **Nature Immunology**, v. 18, n. 1, p. 74–85, 2017.

HEMPEL, L. *et al.* High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 20, n. 5, p. 365–368, 1997.

HENDEN, A. S.; HILL, G. R. Cytokines in graft-versus-host disease. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4604–4612, 2015.

HERVE, B. P. *et al.* Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3362–3368, 1992.

HIBI, M. *et al.* Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1149–1157, 1990.

HILL, G. R. *et al.* Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 3204–3213, 1997.

HILL, G. R.; FERRARA, J. L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone

marrow transplantation. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2754–2759, 2000.

HIRANO, T. *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 73–76, 1986.

HIRANO, T. *et al.* Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1797–1801, 1988.

HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **International Reviews of Immunology**, v. 16, n. 3-4, p. 249-284.

HIRANO, T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 86, n. 7, p. 717–730, 2010.

HIROKAWA, M. Serum tumor necrosis factor- α levels in allogeneic bone marrow transplant recipients with acute leukemia. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 159, p. 237–244, 1989.

HOLLER, E. *et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. **Blood**, v. 75, n. 4, p. 1011–1016, 1990.

HOLLER, E. *et al.* Low incidence of transplant-related complications in patients with chronic release of tumor necrosis factor-alpha before admission to bone marrow transplantation: A clinical correlate of cytokine desensitization? **Pathobiology**, v. 59, n. 3, p. 171–175, 1991.

HOLLER, E. Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 6, p. 479–484, Nov. 2002.

HOLLER, E. *et al.* Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4189-4193, 2006.

HOLTAN, S. G.; PASQUINI, M.; WEISDORF, D. J. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. **Blood**, v. 124, n. 3, p. 363–373, 2014.

HONG, C. J. *et al.* Interleukin-6 genetic polymorphism and Chinese major depression. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 4, p. 202–205, 2005.

HORNING, S. J. *et al.* The Stanford experience with high-dose etoposide cytoreductive regimens and autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma: Preliminary data. **Annals of Oncology**, v. 2, n. SUPPL. 1, p. 47–50, 1991.

HUNGNESS, E. S. *et al.* Transcription factors C/EBP- β and - δ regulate IL-6 production in IL-1 β -stimulated human enterocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 64–70, 2002.

IMAMURA, M. *et al.* Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon-gamma, and tumor necrosis factor-alpha in graft-

versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**, v. 13, n. 6, p. 745–751, 1994a.

IMAMURA, M. *et al.* Hyperacute graft-versus-host disease accompanied by increased serum interleukin-6 levels. **International Journal of Hematology**, v. 60, n. 1, p. 85–89, 1994b.

IMAMURA, M. *et al.* Effects of interleukin-6 on hematopoiesis in allogeneic and syngeneic bone marrow chimeras. **Immunobiology**, v. 191, n. 1, p. 21–37, 1994.

INAMOTO, Y. *et al.* Investigator feedback about the 2005 NIH diagnostic and scoring criteria for chronic GVHD. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 4, p. 532–538, 2014.

IP, N. Y. *et al.* CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1121–1132, 1992.

IRAVANI, M. *et al.* Fludarabine and busulfan as a myeloablative conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in high- and standard-risk leukemic patients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 2, p. 105–110, 2007.

ISHIBASHI, T. *et al.* Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1241–1244, 1989.

JACOB, C. O. *et al.* Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 3, p. 1233–1237, 1990.

JAGASIA, M. *et al.* Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 296–307, 2012.

JAGASIA, M. H. *et al.* National Institutes of Health Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-Host disease: I. The 2014 diagnosis and staging working group report. **Biology of Blood Marrow and Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 389–401, 2015.

JENG, J. R. *et al.* Association of interleukin-6 gene G-174C polymorphism and plasma plasminogen activator inhibitor-1 level in Chinese patients with and without hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 4, p. 517–522, 2005.

JIANG, S.; HERRERA, O.; LECHLER, R. I. New spectrum of allorecognition pathways: Implications for graft rejection and transplantation tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 5, p. 550–557, 2004.

JONES R. J, SANTOS, G. W. New conditioning regimens for high risk marrow transplants. **Bone Marrow Transplantation**, v. 4, n. 4, p. 15–17, 1989.

JONES, S. A; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6 / gp130 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 9, p. 3375–3383, 2011.

KAGI, D. *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated

cytotoxicity. **Science**, v. 265, p. 528–530, 1994.

KARABON, L. *et al.* 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. **Human Immunology**, v. 66, n. 6, p. 700–710, 2005.

KARIMI, M. H. *et al.* Graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. **International Journal of Transplantation Research**, v. 1, p. 37–45, 2019.

KAYABA, H. *et al.* Serum markers of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 1, p. S40–S44, 2000.

KERNAN, N. A. *et al.* Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. **Blood**, v. 68, n. 3, p. 770–773, 2016.

KESARWANI, P. *et al.* Do IL-4 intron 3 VNTR and IL-6 (-174) G/C variants reflect ethnic variation? A comparative study between the global and North Indian populations. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 9, n. 1, p. 76–80, 2008.

KHOURI, I. F. *et al.* Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: Low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3595–3599, 2001.

KIM, G. W. *et al.* IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: Past, present, and future. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 575–584, 2015.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v. 86, p. 1243–1254, 1995.

KISHIMOTO, T. Il-6 From laboratory to bedside. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 28, n. 28, p. 177–185, 2005.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. SUPPL 2:S2, 2006.

KISHIMOTO, T. IL-6: From its discovery to clinical applications. **International Immunology**, v. 22, n. 5, p. 347–352, 2010.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Hescience in japan: articles Interleukin-6 and Its Receptor : A Paradigm for Cytokines. **Science**, v. 258, n. October, p. 593–597, 1992.

KOCH, W. *et al.* Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 159, n. 1, p. 137–144, 2001.

KOPF, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339–342, 1994.

KORNGOLD, R.; SPRENT, J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow

transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 6, p. 1687–1698, 1978.

KOTAKE, S. *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 1, p. 88–95, 2009.

KOYAMA, M. *et al.* Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 1, p. 135–142, 2012.

KRAMMER, P. H. The immune system B cells. **Nature**, v. 407, n. October, p. 789–795, 2000.

KRENGER, W. *et al.* Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. **Blood**, v. 76, n. 9, p. 1867–1871, 1996a.

KRENGER, W. *et al.* Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 1113–1121, 1996b.

KRENGER, W.F. J. Dysregulation of cytokines during graft-versus-host disease. **Journal of Hematotherapy**, v. 5, n. 1, p. 3–14, 1996.

LANDI, S. *et al.* Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 63, n. 13, p. 3560–3566, 2003.

LANGLEY, R. G. B. *et al.* Apoptosis is the mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 2, p. 187–190, 1996.

LANGREHR, J. M. *et al.* Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. August, p. 679–683, 1992.

LAUGHLIN, M. J. *et al.* Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 24, p. 1815–1822, 2001.

LEE, M. K.; PARK, A. J.; KIM, D. H. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 promoter gene polymorphisms are not associated with an increased risk of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 77, n. 6, p. 1304–1305, 2002.

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

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; JEFFREY, A. CD28 / B7 system of T cell costimulation. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 233–258, 1996.

LIN, H. Y. *et al.* Peptidoglycan induces interleukin-6 expression through the TLR2 receptor, JNK, c-Jun, and AP-1 pathways in microglia. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 6, p. 1573–1582, 2011.

LIN, M. T. *et al.* Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 23, p. 2201–2210, 2003.

LIN, M. T. *et al.* Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: Synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor β genotype of donor. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3995–4001, 2005.

LINDNER, B. H. *et al.* Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1931–1938, 1997.

LIU, F. *et al.* Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2583–2590, 1997.

LIU, H. *et al.* Busulfan plus fludarabine as a myeloablative conditioning regimen compared with busulfan plus cyclophosphamide for acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective and multicenter study. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 1, p. 15, 2013.

LIU, J. *et al.* Association of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter with risk of prostate cancer in Chinese. **BMC Cancer**, v. 10, p. 456, 2010.

LOISEAU, P. *et al.* HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 13, n. 8, p. 965–974, 2007.

LOTZ, M.; GUERNE, P. A. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 4, p. 2017–2020, 1991.

LOWIN, B. *et al.* Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. **Nature**, v. 370, n. 6491, p. 650–652, 1994.

LU, Y.; WALLER, E. K. Dichotomous role of interferon- γ in allogeneic bone marrow transplant. **Biology of Blood Marrow and Transplantation**, v. 15, n. 11, p. 1347–1353, 2010.

LUGER, T. A.; SCHWARZ, T. Evidence for an epidermal cytokine network. **Journal of Investigative Dermatology**, Pages S100-S104, 1990.

LUNN, R. A. *et al.* Cytokine profiles in stem cell transplantation: Possible use as a predictor of graft-versus-host disease. **Hematology**, v. 10, n. 2, p. 107–114, 2005.

LUST, J. *et al.* Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. **Cytokine**, v. 4, n. 2, p. 96–100, 1992.

MACKALL, C. L. *et al.* Age, Thymopoiesis, and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 3, p. 143–149, 1995.

MACKALL, C. L. *et al.* Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3700–3707, 1997.

MAEDA, Y. *et al.* Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8⁺ T cells during acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2023–2027, 2005.

MAGENAU, J.; RUNAAS, L.; REDDY, P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology**, v. 173, n. 2, p. 190–205, 2016.

MAITRA, A. *et al.* Polymorphisms in the IL6 gene in Asian Indian families with premature coronary artery disease - The Indian Atherosclerosis Research Study. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 5, p. 944–950, 2008.

MALONEY, D. G. *et al.* Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3447–3454, 2013.

MANGAN, P. R. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.

MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARC FELDMANN. *et al.* Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 397–440, 1996.

MARIS, M. B. *et al.* HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2021–2030, 2003.

MARSH, S. G. E. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2018. **HLA**, v. 91, n. 6, p. 563–574, 2018.

MARTIN, P. *et al.* Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-versus-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched-sibling or unrelated donors. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, n. 9, p. 881–887, 2003.

MARTIN, P. J. *et al.* A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. **Blood**, v. 76, n. 8, p. 1464–1472, 1990.

MARTIN, P. J. *et al.* HLA and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 4, n. 3, p. 128–133, 1998.

- MÄRZ, P. *et al.* Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 2765–2773, 1997.
- MÄRZ, P.; OTTEN, U.; ROSE-JOHN, S. Neuronal activities of IL-6 type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 2995–3004, 1999.
- MATZINGER, P. The danger model: A renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301–305, 2002.
- MAZUR, G. *et al.* IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. **Immunology Letters**, v. 96, n. 2, p. 241–246, 2005.
- MEENAGH, A. *et al.* Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. **Human Immunology**, v. 63, n. 11, p. 1055–1061, 2002.
- MELICONI, R. *et al.* Increased serum concentrations of tumour necrosis factor in beta thalassaemia: effect of bone marrow transplantation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 61–65, 1992.
- MERAD, M. *et al.* Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. **Nature Medicine**, v. 10, n. 5, p. 510–517, 2004.
- MICHAUD, D. S. *et al.* Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 8, p. 4525–4530, 2006.
- MIDDLETON, P. G. *et al.* Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3943–3948, 1998.
- MIDDLETON, P. G. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 30, n. 4, p. 223–228, 2002.
- MIDDLETON, P. G. *et al.* Oestrogen receptor α gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, n. 1, p. 41–47, 2003.
- MIELCAREK, M. *et al.* Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation**, v. 102, n. 2, p. 756–762, 2003.
- MIELCAREK, M.; STORB, R. Graft-vs-host disease after non-myeloablative hematopoietic cell transplantation. **Leukemia & Lymphoma**, v. 46, n. 9, p. 1251–1260, 2005.
- MIHARA, M. *et al.* IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 122, n. 4, p. 143–159, 2012.
- MILLER, J. S. *et al.* Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-

versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 5058–5061, 2007.

MIN, C. K. *et al.* The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF- α , IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 28, n. 10, p. 935–940, 2001.

MINELLI, C. *et al.* The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 34, n. 6, p. 1319–1328, 2005.

MLYNARCZEWSKA, A. *et al.* Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 34, n. 4, p. 339–344, 2004.

MOHAN, K. *et al.* IFN- γ -inducible T cell chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration: differential regulation by IFN- γ and TNF- α . **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6420–6428, 2002.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10. **Annual Review Immunology**, v. 11, p. 165–190, 1993.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MOREAU, P. *et al.* Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: Final analysis of the Intergroupe Francop. **Blood**, v. 99, n. 3, p. 731–735, 2002.

MORRIS, E. S.; HILL, G. R. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology**, v. 137, n. 1, p. 3–19, 2007.

MORRIS, G. P. *et al.* Dual receptor T cells mediate pathologic alloreactivity in patients with acute graft-versus-host disease. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 188, p. 1–18, 2013.

MOSMANN, T. Properties and functions of interleukin-10. **Advances in Immunology**, v. 56, n. 16, p. 1–26, 1994.

MOSMANN, T. R.; Coffman. R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 145–173, 1989.

MOWAT, A. M. Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. **Immunology**, v. 68, n. 1, p. 18–23, 1989.

MUELLER, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 21–27, 2010.

MULLEN, A. C. *et al.* Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. **Science**, v. 292, n. 5523, p. 1907–1910, 2001.

MULLIGHAN, C. *et al.* Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. **Transplantation**, v. 77, n. 4, p. 587–596, 2004.

MULLIGHAN, C. G.; BARDY, P. G. Advances in the genomics of allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. **Drug Development Research**, v. 62, n. 3, p. 273–292, 2004.

MURAI, M. *et al.* Active participation of CCR5+CD8+ T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 1, p. 49–57, 1999.

MURAI, M. *et al.* Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. **Nature Immunology**, v. 4, n. 2, p. 154–160, 2003.

MUTA, H. *et al.* CD30 signals integrate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocyte trafficking signals, and signals for proliferation and apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5105–5111, 2000.

NACHBAUR, D. *et al.* Phenotype, function and chimaerism of monocyte-derived blood dendritic cells after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 123, n. 1, p. 119–126, 2003.

NAKA, T. *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 924–929, 1997.

NAKAMURA, H. *et al.* Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN- γ in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 1, p. S45–S50, 2000.

NASH, R. A. *et al.* Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. **Blood**, v. 80, n. 7, p. 1838–1845, 1992.

NASSEREDDINE, S. *et al.* Acute graft versus host disease: a comprehensive review. **Anticancer Research**, v. 37, n. 4, p. 1547–1555, 2017.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 3, p. 109–119, 2008.

NCCLS. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada - oitava edição. NCCLS documento M2-A8,v.23, n.1, 2003.

NEEFJES, J. *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.

NESTEL, F. P. *et al.* Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 2, p. 405–413, 1992.

NG, A. P.; ALEXANDER, W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. **Cell**

Death Discovery, v. 3, n. December 2016, p. 17002, 2017.

NISHIMOTO, N. *et al.* Humanized anti – interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2627–2633, 2005.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6: From bench to bedside. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 11, p. 619–626, 2006.

NOGUEIRA DE SOUZA, N. C. *et al.* Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1278–1282, 2006.

NORDLANDER, A. *et al.* The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 4, p. 1133–1136, 2002.

NURIEVA, R. I. *et al.* B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14163–14168, 2003.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 1, p. 37–45, 2002.

OBBERG, H. H. *et al.* Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells. **International Immunology**, v. 18, n. 4, p. 555–563, 2006.

OGNJANOVIC, S. *et al.* Serum CRP and IL-6, genetic variants and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. **Cancer Causes and Control**, v. 21, n. 7, p. 1131–1138, 2010.

OLDFIELD, V.; DHILLON, S.; PLOSKER, G. L. Tocilizumab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 69, n. 5, p. 609–632, 2009.

PACZESNY, S. *et al.* A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 113, n. 2, p. 273–278, 2009.

PACZESNY, S. *et al.* New perspectives on the biology of acute GVHD. **Bone Marrow Transplantation**, v. 45, n. 1, p. 1–11, 2010.

PACZESNY, S. Biomarkers for posttransplantation outcomes. **Blood**, v. 131, n. 20, p. 2193–2204, 2018.

PAN, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. **Science**, v. 277, n. 5327, p. 815–818, 1997a.

PAN, G. *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 111–113, 1997b.

PAN, M. *et al.* Interleukin 6 promoter polymorphisms in normal Han Chinese population: frequencies and effects on inflammatory markers. **Journal of Investigative Medicine**, v. 59, n. 2, p. 272–276, 2011.

PAPANICOLAOU, D. A. *et al.* The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 2, p. 127–137, 1998.

PARK, B. L. *et al.* Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 76–82, 2003.

PASARE, C. Toll pathway–dependent blockade of CD4+CD25+ T cell–mediated suppression by dendritic cells. **Science**, v. 299, n. 2003, p. 1033–1037, 2003.

PASQUINI, M. C. Impact of graft-versus-host disease on survival. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 21, n. 2, p. 193–204, 2008.

PASSWEG, J. R. *et al.* Impact of drug development on the use of stem cell transplantation: A report by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Bone Marrow Transplantation**, v. 52, n. 2, p. 191–196, 2017.

PAVLETIC, S. Z.; VOGELSANG, G. B.; LEE, S. J. 2014 National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: preface to the series. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 387–388, 2015.

PENNICA, D. *et al.* Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p.10915-10922, 1995.

PETERSDORF, E. W. *et al.* Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors. **Blood**, v. 89, n. 5, p. 1818–1823, 1997.

PETERSDORF, E. W. *et al.* Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3515–3520, 1998.

PETERSDORF, E. W.; MALKKI, M. Genetics of risk factors for graft-versus-host disease. **Seminars in Hematology**, v. 43, n. 1, p. 11–23, 2006.

PIHUSCH, M. *et al.* Evaluation of C-reactive protein , interleukin-6 , and procalcitonin levels in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **European Journal of Haematology**, v. 76, n. 2, p. 93–101, 2006.

PIPER, C.; DROBYSKI, W. R. Inflammatory cytokine networks in gastrointestinal tract graft vs. host disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. February, p. 163, 2019.

POLI, F. *et al.* Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. **European Journal of Immunogenetics**, v. 29, n. 3, p. 237–240, 2002.

PONEC, R. J.; HACKMAN, R. C.; MCDONALD, G. B. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 49, n. 5, p. 612–621, 1999.

PORTA, F.; LOCATELLI, F.; BURGIO, G. R. Hematopoietic stem cell transplantation: 40

Years of continuous progress and evolution. **Haematologica**, v. 93, n. 11, p. 1607–1610, 2008.

PRAVICA, V. *et al.* In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **European Journal of Immunogenetics**, v. 26, n. 1, p. 1–3, 1999.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863–866, 2000.

RAIMONDI, G. *et al.* Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 2808–2816, 2006.

RAVAGLIA, G. *et al.* Associations of the -174 G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. **Biogerontology**, v. 6, n. 6, p. 415–423, 2005.

RAY, A. *et al.* Activation of the human “beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6” promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 18, p. 6701–6705, 1988.

REDDY, P. *et al.* A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. **Nature Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1244–1249, 2005.

REDDY, P.; FERRARA, J. L. M. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 4, p. 187–194, 2003.

REDDY, P.; FERRARA, J. L. M. Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia responses. **Hematology**, Elsevier Inc., 1640-1688, 2018.

REFAELI, Y. *et al.* Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 999–1005, 2002.

REMBERGER, M. *et al.* Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. **European Journal of Haematology**, v. 70, n. 6, p. 384–391, 2003.

REMBERGER, M. Cytokine production during myeloablative and reduced intensity therapy before allogeneic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 89, n. 8, p. 1–2, 2004.

REMBERGER, M. *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease grades II-IV after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with unrelated donors - A single centre study. **Bone Marrow Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 399–405, 2008.

REMBERGER, M.; RINGDÉN, O. Serum levels of cytokines after bone marrow transplantation: increased IL-8 levels during severe veno-occlusive disease of the liver. **European Journal of Haematology**, v. 59, n. 4, p. 254–262, 1997.

REYNARD, M. P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C. V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor- α , interleukin-10, interferon- γ and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **European Journal of Immunogenetics**, v. 27, n. 4, p. 241–249, 2000.

RIDDELL, F. R. *et al.* High-dose cytarabine and total body irradiation with or without cyclophosphamide as a preparative regimen for marrow transplantation for acute leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 4, p. 576–582, 1988.

ROBINET, E. *et al.* Serum levels and receptor expression of tumor necrosis factor- α following human allogeneic and autologous bone marrow transplantation. **Transplantation**, v. 53, n. 3, p. 574–579, 1992.

ROCHA, V. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. **Blood**, v. 100, n. 12, p. 3908–3918, 2002.

ROCHA, V. *et al.* Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 22, p. 2276–2285, 2004.

ROLINK, A. G.; GLEICHMANN, E. Allosuppressor- and allohelper-T cells in acute and chronic graft-vs.-host (GVH) disease. III. Different Lyt subsets of donor T cells induce different pathological syndromes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, n. 2, p. 546–558, 1983.

ROOD, J. J. VAN *et al.* Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1572–1577, 2002.

ROSE-JOHN, S. *et al.* Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 2, p. 227–236, 2006.

ROSE-JOHN, S. *et al.* The IL-6 / sIL-6R complex as a novel. **Expert Opinion Therapeutics and Targets**, v. 11, p. 613–624, 2007.

ROSE-JOHN, S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 787–797, 2015.

ROSE-JOHN, S.; HEINRICH, P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. **Biochemical Journal**, v. 300, n. 2, p. 281–290, 1994.

ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M. F. IL-6 trans-signaling: The heat is on. **Immunity**, v. 20, n. 1, p. 2–4, 2004.

ROUSSET, F. *et al.* Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 3, p. 1890–1893, 1992.

ROWLINGS, P. A. *et al.* IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease:

Retrospective comparison with Glucksberg grade. **British Journal of Haematology**, v. 97, n. 4, p. 855–864, 1997.

RUZEK, B. M. C. *et al.* Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1185–1192, 1997.

SACKSTEIN, R. A revision of Billingham's tenets: The central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 2–8, 2006.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455–458, 2000.

SAKATA, N. *et al.* Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: The ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplantation**, v. 27, n. 11, p. 1153–1161, 2001.

SAKIHAMA, T.; SMOLYAR, A.; REINHERZ, E. L. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. **Immunology Today**, v. 16, n. 12, p. 581–587, 1995.

SALGAME, P. *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 279–282, 1991.

SATO, K. *et al.* Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. **Cancer Research**, v. 53, n. 4, p. 851–856, 1993.

SCHELLER, J. *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SCHELLER, J.; GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 2–12, 2014.

SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 and its receptor: From bench to bedside. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 195, n. 4, p. 173–183, 2006.

SCHMALTZ, C. *et al.* Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. **Blood**, v. 97, n. 9, p. 2886–2895, 2001.

SCHOTS, R. *et al.* Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. **Leukemia**, v. 17, n. 6, p. 1150–1156, 2003.

SCHROEDER, T. Hematopoietic stem cell heterogeneity: Subtypes, not unpredictable behavior. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 203–207, 2010.

SCHROERS, A. Dynamics of the gp130 cytokine complex: A model for assembly on the

cellular membrane. **Protein Science**, v. 14, n. 3, p. 783–790, 2005.

SCOTT, B. *et al.* Targeted busulfan and cyclophosphamide as compared to busulfan and TBI as preparative regimens for transplantation in patients with advanced MDS or transformation to AML. **Leukemia and Lymphoma**, v. 45, n. 12, p. 2409–2417, 2004.

SERADA, S. *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9041–9046, 2008.

SHAH, R. *et al.* TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: A pilot study. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 1, p. 50–56, 2009.

SHANTSILA, E.; LIP, G. Y. H. Monocytes in acute coronary syndromes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 10, p. 1433–1438, 2009.

SHARMA, S. *et al.* Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n.165, 2010.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 116–126, 2002.

SHERIDAN, J. P. *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. **Science**, v. 277, n. 5327, p. 818–821, 1997.

SHIZURU, J. A.; NEGRIN, R. S.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hemato-lymphoid system. **Annual Review of Medicine**, v. 56, n. 1, p. 509–538, 2005.

SHLOMCHIK, W. D. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. **Science**, v. 285, n. 5426, p. 412–415, 1999.

SIMPSON, R. J. *et al.* Interleukin-6: structure-function relationships. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 6, n. 5, p. 929–955, 1997.

SINGH, A. K.; MCGUIRK, J. P. Allogeneic stem cell transplantation: A historical and scientific overview. **Cancer Research**, v. 76, n. 22, p. 6445–6451, 2016.

SIVULA, J. *et al.* Association of IL-10 and IL-10R β gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. **BMC Immunology**, v. 10, n. 1, p. 24, 2009.

SNOVER, D. C. *et al.* Hepatic graft versus host disease: a study of the predictive value of liver biopsies in diagnosis. **Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 123–130, 1984.

SNOVER, D. C. *et al.* A histopathologic study of gastric and small intestinal graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Human Pathology**, v. 16, n. 4, p. 387–392, 1985.

SOCIE, G. *et al.* Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-

host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation**, v. 72, n. 4, p. 699–706, 2001.

SOFI, M. H. *et al.* Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKCtheta and NF-kappaB induces Th2 cytokine production. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 7, p. 1443–1450, 2009.

SORROR, M. L. *et al.* Pretransplant comorbidities predict severity of acute graft-versus-host disease and subsequent mortality. **Blood**, v. 124, n. 2, p. 287–295, 2014.

SPOOREN, A. *et al.* Interleukin-6, a mental cytokine. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1–2, p. 157–183, 2011.

SULLIVAN, K. *et al.* Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. **Blood**, v. 73, n. 6, p. 1720–1728, 1989.

SUN, Y. *et al.* Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. **Translational Research**, v. 150, n. 4, p. 197–214, 2007.

SUZUKI, M. *et al.* Apoptosis of murine large intestine in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers. **Transplantation**, v. 27, n. 57, p. 1284–1287, 1994.

SVENBERG, P. *et al.* Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism. **Bone Marrow Transplantation**, v. 44, n. 11, p. 757–763, 2009.

SWAIN, S. L. *et al.* Helper T+cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunological Reviews**, v. 123, n. 1, p. 115–144, 1991.

SYMINGTON, F. W. *et al.* The relationship of serum IL-6 levels to acute graft-versus-host disease and hepatorenal disease after human bone marrow transplantation. **Transplantation**, v. 54, n. 3, p. 457–462, 1992.

TAKATSUKA, H. *et al.* Predicting the severity of graft-versus-host disease from interleukin-10 levels after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 1005–1007, 1999.

TAMBUR, A. R. R. *et al.* Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. **Transplantation Proceedings**, v. 33, n. 1–2, p. 502–503, 2001.

TANAKA, M. *et al.* The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. **Leukemia Research**, v. 36, n. 6, p. 699–703, 2012.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 4, p. 288–294, 2014.

TAU, G.; ROTHMAN, P. Biologic functions of the IFN- γ receptors. **Allergy**, v. 54, n. 12, p. 1233–1251, 1999.

TAWARA, I. *et al.* Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 77–88, 2011.

TEDGUI, A. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 515–581, 2006.

TERWEY, T. H. *et al.* CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3322–3330, 2005.

TESHIMA, T. *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. **Nature Medicine**, v. 8, n. 6, p. 575–581, 2002.

THOMAS, E. D. *et al.* Bone-marrow transplantation (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 292, n. 17, p. 895–902, 1975.

THOMAS, E. D. *et al.* Current status of bone marrow transplantation for aplastic anemia and acute leukemia. **Blood**, v. 49, n. 5, p. 671–681, 1977.

THOMAS, E. D. *et al.* Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission using fractionated or single-dose irradiation. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 8, n. 5, p. 817–821, 1982.

THOMAS, E. D. *et al.* Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. **Blood**, v. 38, n. 3, p. 267–287, 1971.

TILG, B. H. *et al.* Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. **Blood**, v. 6, p. 113–118, 1994.

TING, C. *et al.* Genomic studies of GVHD—lessons learned thus far. **Bone Marrow Transplantation**, v. 48, n. 1, p. 4–9, 2013.

TOUBAI, T. *et al.* Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic – derived antigen presenting cells. **Blood**, v. 119, n. 16, p. 3844–3853, 2012a.

TOUBAI, T. *et al.* Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD)—“ Are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 229–239, 2012b.

TOUBAI, T. *et al.* Danger signals and graft-versus-host disease: Current understanding and future perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, p. 1–15, 2016.

TURNER, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 1997.

TVEDT, T. H. A. *et al.* Interleukin-6 in allogeneic stem cell transplantation: Its possible importance for immunoregulation and as a therapeutic target. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, p. 1–15, 2017.

VAN DEN BRINK, M. R. M.; BURAKOFF, S. J. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 4, p. 273–281, 2002.

VAN DER WAART, A. B. *et al.* Targeting the IL17 pathway for the prevention of graft-versus-host disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 752–759, 2014.

VARELIAS, A. *et al.* Lung parenchyma-derived IL-6 promotes IL-17A – dependent acute lung injury after allogeneic stem cell transplantation. **Blood**, v. 125, n. 15, p. 2435–2445, 2015.

VARGAS-ALARCON, G. *et al.* Distribution of the *IL-1RN*, *IL-6*, *IL-10*, *INF- γ* , and *TNF- α* gene polymorphisms in the mexican population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 10, p. 1246–1253, 2012.

VARONA, R. *et al.* CCR6 regulates CD4 T-cell – mediated acute graft-versus-host disease responses. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 18–27, 2005.

VASKU, J. A. *et al.* Heterozygote AG variant of -596 A/G IL-6 gene polymorphism is a marker for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 256–260, 2004.

VELARDI, A. *et al.* NK cells: A lesson from mismatched hematopoietic transplantation. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 9, p. 438–444, 2002.

VELDHOEN, M. *et al.* TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006.

VIEL, D. O. *et al.* IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 6, p. 703–710, Dec. 2007.

VIGORITO, A. C. *et al.* A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. **Bone Marrow Transplantation**, v. 22, n. 12, p. 1145–1151, 1998.

VISENTAINER, J. E. *et al.* Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 11, p. 1044–1050, 2003.

VISENTAINER, J. E. L. *et al.* TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, n. 4–5, p. 287–293, 2008.

VOGELSANG, G. B.; LEE, L.; BENSON-KENNEDY, D. M. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 29–52, 2003.

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

WAGNER, J. E. *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: Influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1611–1618, 2002.

WANG, H. *et al.* Paradoxical effects of IFN- γ in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury. **Blood**, v. 113, n. 15, p. 3612–3619, 2009.

WANG, H.; YANG, Y.-G. The complex and central role of interferon-gamma in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. **Immunological Reviews**, v. 258, n. 1, p. 30–44, 2014.

WASEM, C. *et al.* Accumulation and activation-induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host disease. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2936–2941, 2001.

WEIDEN, P. L. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. **New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 19, p. 1068–1073, 1979.

WEIJTENS, M. *et al.* Reduced graft-versus-host disease-inducing capacity of T cells after activation, culturing, and magnetic cell sorting selection in an allogeneic bone marrow transplantation model in rats. **Human Gene Therapy**, v. 13, n. 2, p. 187–198, 2002.

WEISDORF, D. *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. **Transplantation**, v. 51, n. 6, p. 1197–1203, 1991.

WEKERLE, T. *et al.* Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 12, p. 2037–2044, 1998.

WELNIAK, L. A. *et al.* Opposing roles of interferon-gamma on CD4⁺ T cell-mediated graft-versus-host disease: Effects of conditioning. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 604–612, 2000.

WELNIAK, L. A.; BLAZAR, B. R.; MURPHY, W. J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 139–170, 2007.

WENINGER, W.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokine regulation of naïve T cell traffic in health and disease. **Seminars in Immunology**, v. 15, n. 5, p. 257–270, 2003.

WIESER F. *et al.* Analysis of an interleukin-6 gene promoter polymorphism in women with endometriosis by pyrosequencing. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 32–36, 2003.

WILSON, A. G. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195–3199, 1997.

WOLF, J.; ROSE-JOHN, S.; GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly

regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, n. 1, p. 11–20, 2014.

WOOD, K. J.; GOTO, R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. **Transplantation**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2012.

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

XING, Z. *et al.* Il-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 311–320, 1998.

XUN, B. C. Q. *et al.* Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. **Blood**, v. 83, n. 8, p. 2360–2367, 1994.

YAKOUB-AGHA, I. *et al.* A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. **Leukemia**, v. 20, n. 9, p. 1557–1565, 2006.

YAMASAKI, K. *et al.* Cloning and expression of the human interleukin-6 cloning (BSF-2/IFNI beta 2) receptor. **Science**, v. 241, p. 825–828, 1988.

YANG, Y. G. *et al.* Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 12, p. 2126–2135, 1998.

YANG, Y.; WILSON, J. M. CD40 ligand-dependent T cell activation: Requirement of B7-CD28 signaling through CD40. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1862–1864, 1996.

YASMINEH, W. G.; KAUR, T. P.; BLAZAR, B. R. T. A. Serum catalase as marker of graft-vs-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients: pilot study. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1574–1580, 1995.

YI, T. *et al.* Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. **Blood**, v. 114, n. 14, p. 3101–3112, 2009.

YILMAZ, V.; YENTÜR, S. P.; SARUHAN-DIRESKENELI, G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. **Cytokine**, v. 30, n. 4, p. 188–194, 2005.

YOKOTA, S. *et al.* Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 998–1006, 2008.

ZEISER, R. *et al.* Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: Implications for novel preventive and therapeutic strategies. **Annals of Hematology**, v. 83, n. 9, p. 551–565, 2004.

ZEISER, R. *et al.* Inhibition of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 390–399, 2006.

ZEISER, R.; SOCIÉ, G.; BLAZAR, B. R. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation. **British Journal of Haematology**, v. 175, n. 2, p. 191–207, 2016.

ZHENG, C. *et al.* Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 1, p. 39–45, 2000.

ZHU, P. *et al.* IL-10 promoter polymorphism associated with decreased risk of aGvHD after stem cell transplantation: a meta-analysis. **International Journal of Hematology**, v. 98, n. 1, p. 102–111, Jul. 2013.

ZINTZARAS, E.; LAU, J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 61, n. 7, p. 634–645, 2008.

6 ARTIGO 1

Plasma IL-6 levels and inflammatory response in allo-HSCT

**Association between plasma IL-6 levels and inflammatory
response in children and adults following allogeneic peripheral
blood stem cell transplantation**

Mariela Granero Farias^{1,2}, Bruna de Mello Vicente³, Muriel Habigzang³, Bianca Pfaffenseller², Priscila de Oliveira da Silva², Iuri Vicente Camargo Morkis^{1,2}, Camila Andrade dos Santos², Alessandra Paz², Liane Esteves Daudt^{1,2,3}

1 Graduate Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

2 Hospital de Clínicas de Porto Alegre/HCPA

3 Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

Corresponding author:

Mariela Granero Farias, M.Sc.
Specialized Diagnostic Unit, Flow Cytometry
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcellos, 2350
Porto Alegre, Brazil
90035-903
Phone +55 51 33597779
E-mail: mgfarias@hcpa.edu.br.

ABSTRACT

Acute graft-versus-host disease (a-GVHD) is relevant complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). While there are no blood tests currently capable of predicting a-GVHD, plasma proteins may usefully serve as potential biomarkers. IL-6 is a pleiotropic cytokine produced by several cell types that acts as an acute inflammatory mediator. This study aimed to determine IL-6 levels and genotypes and their association with the presence and severity of a-GVHD in patients submitted to allo-HSCT. Plasma IL-6 levels were determined prior to allo-HSCT and on days 7, 14, 28, 60 and 100 following the procedure. There was an increase in IL-6 levels after allo-HSCT with peaks on days 7 and 14, regardless of the presence of a-GVHD. Pediatric patients in the non-GVHD group showed higher IL-6 levels, and the IL-6 -174 GG genotype was associated with a high plasma cytokine production in both the recipient and donor subjects. IL-6 is an important protein with proinflammatory and anti-inflammatory activity. Further research should focus on better understanding the influence and possible effects of this cytokine on the course of HSCT in pediatric patients as well as the role of genetic influence in this response.

Key-words: allogeneic HSCT, acute GVHD, IL-6, IL-6 Inhibitors, genotype.

1 INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a curative treatment for various hematological, immune and congenital diseases.¹ One of the major complications associated with allo-HSCT is graft-versus-host disease (GVHD). This condition develops in the presence of a proinflammatory milieu and starts upon the conditioning regimen, in which there is an induction of host tissue damage by the release of inflammatory cytokines (IL-1, TNF-alpha, INF-gama, IL-6), and alloactivation of donor T cell and other effector T cell populations.²⁻⁶

Acute GVHD (a-GVHD) remains a significant cause of mortality⁷ and morbidity allo-HSCT-related. Its severity can be clinically graded into four stages (I, II, III and IV) by means of a standardization system which evaluates the three main target organs involved, namely: skin, gastrointestinal tract and liver.⁸ The diagnosis of a-GVHD is based on clinical criteria, which can be confirmed by a biopsy of these three organs.⁹

Despite the lethality of this condition, there are currently no validated laboratory tests for the diagnosis of a-GVHD,¹⁰⁻¹⁶ although several blood proteins have been described as potential biomarkers. As cytokines are released during the conditioning regimen and throughout the post-transplant period, they can be used as markers for a-GVHD^{12,17-19}, thereby enabling the prediction of the risk of disease development, early therapy, and better patient's survival rates and quality of life.²⁰

IL-6 is a pleiotropic cytokine produced by several cell types,²¹ including B cells, T cells, fibroblasts, endothelial cells, monocytes and keratinocytes.²² It is a multifunctional cytokine with a central role in host defense.²³ Among several functions, IL-6 serves as a stimulus for hepatic acute phase response during infection and injury; induces differentiation and/or activation of macrophages and T cells; induces an increase and the ultimate

differentiation of B cells; supports multipotential colony formation by hematopoietic stem cells and promotes neural differentiation. IL-6 is of particular interest in the biology of a-GVHD as it plays a central role in the transformation of naive T cells into regulatory or proinflammatory T cells.^{24,25}

IL-6 is an acute phase protein with pro-inflammatory or anti-inflammatory effects depending on the signaling pathway that is activated. The classical pathway is formed by the complex IL-6 - which binds to the membrane receptor mIL-6R - and the glycoprotein gp130. This pathway mediates important anti-inflammatory effects for immunoregulation, metabolic control, and tissue regeneration.²⁶ In the trans-signaling pathway, in the absence of mIL-6R, IL-6 binds to a soluble receptor (sIL-6R) and to gp130, thereby triggering an acute and chronic inflammatory activity, as it is the case in severe autoimmune diseases.^{27,28} The importance of IL-6 in a-GVHD has been evidenced by clinical studies showing that patients with elevated plasma IL-6 levels,²⁹ or those in which the genotype of both the recipient and donor caused increased cytokine production, have a higher incidence and severity of a-GVHD.³⁰⁻³² Nevertheless, there are few studies showing the relationship between IL-6 levels or its genotypic profile with the presence and severity of a-GVHD in pediatric patients.

The IL-6 gene, mapped on chromosome 7p21, presents two repeated numerical variables and five simple nucleotide polymorphisms. The production of this cytokine is affected by a functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the IL-6 promoter region at position -174 (G/C). The GG and GC genotypes of IL-6 -174 have been associated with high cytokine production.³³

Administration of a human antibody against IL-6 (IL-6R), which prevents the cytokine from binding to its receptor, was effective in treating a variety of inflammatory diseases. Of note, the anti-IL6 treatment has been approved for autoimmune and neoplastic diseases,³⁴ so it

could be potentially used in the future in patients with high IL-6 levels undergoing allo-HSCT.

This study aimed to determine by flow cytometry the levels of IL-6 as a potential biomarker for a-GVHD in pediatric and adult patients undergoing allo-HSCT. In addition, the relationship between IL-6 levels and the clinical diagnosis of a-GVHD in these populations was further investigated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study Population

This study included consecutive adult and pediatric patients and their respective donors submitted to allo-HSCT in an university hospital in Porto Alegre, RS, Brazil. The samples were obtained from April 2015 to April 2018. To determine plasma IL-6 levels, peripheral blood samples were obtained at different timepoints, namely: prior to allo-HSCT and on days 7, 14, 28, 60 and 100, following the procedure. Study participants were divided into two groups based on the presence or absence of a-GVHD and on the severity of the disease, as follows: mild (grade 0-I) or clinically significant (grade II-IV) a-GVHD. The sample was also evaluated by age (≤ 18 and >18 years). For the molecular evaluation of IL-6 encoding gene, peripheral blood or bone marrow samples from the patients and their respective donors were used prior to HSCT.

Low-resolution HLA serological typing for HLA-A, -B and -DRB1 was performed using the Luminex Labscan 100 analyzer (Luminex Corp, Austin, TX-USA) for related-donor transplants. High-resolution HLA typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 was

performed on the ABI 3500 XL Dynal sequencer (Applied Biosystems, New York, USA) for unrelated-donor transplants.

The myeloablative conditioning regimen used was Busulfan/Cyclophosphamide (BuCy) and total body irradiation (TBI) or Busulfan/Cyclophosphamide/Etoposide. The non-myeloablative regimen consisted of Fludarabine/ Busulfan/Melphalan combinations, while the haploidentical regimen consisted of cyclophosphamide after transplantation. Prophylaxis of a-GVHD consisted of a combination of cyclosporin A with methotrexate or mycophenolate mofetil (MMF). GVHD grading (0-IV) was established according to Glucksberg et al. criteria.³⁵ The diagnosis of the condition was clinical, either in the presence or absence of histopathological confirmation.

This study was previously approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre under protocol no. 14-0607. All patients and donors (or their legal guardians) who participated in the study signed an Informed Consent Form.

2.2 IL-6 quantification

Patient samples for IL-6 quantification were centrifuged and the plasma was immediately separated and frozen at -80 °C until use. For the molecular analysis, DNA was extracted from the samples and stored at -80 °C for Real-Time PCR analysis.

Plasma IL-6 concentration was determined by flow cytometry using a BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit (IL-6 Human Soluble Protein Flex Set, BD Biosciences, San Diego, CA). The analytical procedure was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were incubated with cytokine-capture beads and their respective conjugate detection antibody at room temperature and protected from light. The samples were washed and submitted to FACSCalibur flow cytometer equipment (BD

Biosciences, San Diego, CA) for data acquisition. A standard curve was made using the CBA Analysis Software FCAP Array™ 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA). An R^2 greater than 0.99 was obtained and the results were generated from the logistic equation.

2.3 Molecular analysis

Bone marrow or peripheral blood samples were collected into K₂EDTA from patients and their respective donors prior to allo-HSCT. DNA was extracted using the Invitrogen extraction kit on iPrep™ Purification Instrument (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA). DNA was quantified using Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA), yielding a concentration of 20 Mm. DNA samples were frozen at -80 °C for further reaction. A customized primer was used to identify the polymorphism in the promoter region of IL-6 -174 G/C gene (rs1800795). The reaction was amplified in real-time PCR in the Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and analyzed on Step One software v 2.3.

2.4 Statistical analysis

For the statistical analysis, the patients were analyzed in the general population and then stratified by age. The groups were divided into: GVHD (presence or absence), severity (mild and severe), conditioning (myeloablative and non-myeloablative), use of ATG (yes or no), and culture (positive or negative) and the IL-6 levels evaluated in periods.

SPSS vs 18 software was used for statistical analysis. The data were analyzed descriptively by median and P25-P75 percentiles. Generalized Estimating Equations (GEE), Bonferroni tests, as well as pairwise comparisons, were used to analyze the association of IL-

6 with the other variables and periods. The distribution of the genotypes was tested for compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-square test. The value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

A total of 85 patients submitted to allo-HSCT were evaluated in the first 100 days following transplantation, of which 48 (56.5%) were males, with a mean age of 15 years (8.5-31.5 years). Of the total sample, 34 (41.5%) patients developed a-GVHD; and 30 patients (36.6%) died, although their death was not associated with the presence of a-GVHD ($P=1.000$). The clinical characteristics of recipients and donors (in the total population and by age group) and the comparison between the groups are presented in Table 1. There were no differences in the characteristics related to recipients and to the transplantation procedure in adults and children.

3.1 Association between serum IL-6 levels, acute GVHD and death

In the analysis of the total population, there was no statistical association between serum IL-6 levels and the presence ($P=0.055$) or severity ($P=0.195$) of a-GVHD. When the sample was analyzed by age group, higher IL-6 levels were detected in children who did not develop a-GVHD as compared to those whom did ($P=0.001$) (Figure 1A). The follow-up analysis indicated an increase in IL-6 levels on days 7 and 14 ($P < 0.001$), regardless of the a-GVHD grading; after this period there was no difference in relation to baseline levels. IL-6 levels were not associated with death in children ($P=0.169$), but high cytokine levels were associated with death in adults ($P=0.016$) (Figure 1B).

3.2 Association between serum IL-6 levels and the conditioning regimen

A total of 41 (48.8%) patients were submitted to myeloablative conditioning regimen, whereas 43 (51.2%) were submitted to non-myeloablative conditioning. There was no significant difference between plasma IL-6 levels and the conditioning regimen ($P=0.775$) in the total population, nor with the use of antithymoglobulin (ATG) ($P=0.135$). The analysis by age group also revealed no association of IL-6 levels with the conditioning regimen in children ($P=0.686$) or adults ($P=0.771$), nor in relation to the use of ATG ($P=0.111$ and $P=0.604$, respectively).

3.3 Association between serum IL-6 levels and inflammation

Serum IL-6 levels are strongly associated with increased C-reactive protein (CRP) concentrations. Higher levels of IL-6 were detected in patients with CRP values above the normal range ($\geq 5\text{mg/dL}$) ($P<0.001$) and in patients with fever ($P<0.001$) (Figure 2), regardless of the timepoint ($P=0.673$ and $P=0.055$). There was no association between cytokine increase and culture test positivity ($P=0.944$). Similar findings were observed when the sample was analyzed by age group.

3.4 Association between serum IL-6 levels and IL-6 regulatory gene polymorphisms

Table 1 shows the distribution of genotypes and alleles in the total population and by age group. No significant difference was found between the individual IL-6 genotypes of recipients ($P=0.109$) and donors ($P=0.461$) and their respective plasma protein levels. In the analysis by age group, there was no association of the individual genotypes of children ($P=0.052$) and adults ($P=0.674$) with plasma IL-6 levels. Nevertheless, pairwise comparisons

revealed that the GG genotype is associated with higher IL-6 levels than the CC one (P=0.046) in pediatric patients. In the group of donors, there was a significant association between genotype and protein levels in children (P=0.047), but not in adults (P=0.704), as shown in Figure 3. Lastly, the GG genotype of donors in the pediatric group was associated with higher levels of IL-6 in relation to the CC genotype (P=0.045). All IL-6 measurements during the 100-day follow-up period are presented in Table 3.

4 DISCUSSION

The discovery of new allo-HSCT biomarkers is central to predict a-GVHD before the onset of the first clinical signs and, thereby, to determine HSCT prognosis. The ability to identify high-risk patients who are unlikely to respond to traditional therapies may be useful in defining a new treatment, with adjusted therapeutic settings such as more intensive monitoring and/or preventive care.³⁶

The diagnosis of a-GVHD depends on clinical features, sometimes indistinguishable from other causes, and requires invasive procedures to be carried out, e.g. skin biopsy, colonoscopy, bronchoscopy and bronchoalveolar lavage.³⁷ In addition to that, tests based on the patient's clinical and histopathological characteristics have also significant limitations. Thus, predictive and non-invasive biomarkers to improve the diagnosis of a-GVHD are desirable in order to optimize the care and prognosis of allo-HSCT recipient patients.

IL-6 is an important mediator of pro-inflammatory²² and anti-inflammatory^{38,39} processes and plays a pivotal role in the pathophysiology of a-GVHD. Patients with this condition have been reported to have increased plasma or serum IL-6 levels.⁴⁰ In the context of allo-HSCT, IL-6 has a role of mediator during acute phase inflammation and coordinates the differentiation of Th17, regulatory and effector T cells.^{41,42} In our study, we quantitated

plasma IL-6 levels and determined their association with the presence and severity of a-GVHD for 100 days following allo-HSCT. Then we further investigated the association of genetic polymorphisms with cytokine levels.

There are several methods for serum or plasma cytokine quantification, e.g. ELISA is the most conventional approach. However, in our study we opted for flow cytometry because this technique has the following advantages over traditional methods for plasma IL-6 quantification:^{43,44} faster execution; greater sensitivity and reproducibility; no additional dilutions needed for very concentrated samples, best cost-effectiveness ratio;⁴⁴⁻⁴⁶ allows cytokine quantification using a small sample volume; and ideal for post-HSCT patients, especially children.⁴⁵

The IL-6 cytokine acts as an efficient stimulator of the hepatic production of acute phase proteins. There is a direct correlation between increased plasma cytokine levels and increased body temperature or CRP concentrations.⁴⁷ In our study, we found an association of plasma IL-6 concentration with fever and increased CRP concentration, regardless of the presence or absence of a-GVHD, both in the pediatric and adult groups.

It is known that IL-6 is released after the conditioning regimen even before the recipient patient receives cells from the donor⁴⁸. Therefore, we investigated whether IL-6 levels were associated with the conditioning regimen used (myeloablative or non-myeloablative). No significant difference was found between the treatment modalities, nor in relation to the use of ATG.

Our findings showed a variability in IL-6 kinetics throughout the post-transplant period. There was an increase in cytokine serum levels on D7 and D14 after allo-HSCT as compared to baseline levels. However, this increase was not related to the presence or severity of a-GVHD. Consistent with this, Visentainer *et al.*, 2003 found no association between IL-6 concentration and the presence of a-GVHD,^{10,14} but observed some peaks in IL-6 levels in the

post-transplant period.¹⁰ Min et al, 2001 reported an increase in IL-6 levels during the occurrence of grade II a-GVHD in the early post-transplant period.¹⁹ When patients were analyzed by age group, we found that the pediatric group had a lower incidence of a-GVHD and fewer deaths (31.4% and 29.4%) than the adult group (52.9% and 50.0%), respectively. IL-6 levels were found to be higher among children with no a-GVHD (P=0.001), whereas no difference was observed among adults (P=0.404). This can be explained by the anti-inflammatory functions of IL-6. There are also studies showing that glucocorticoids produced as a result of the inflammatory response improve some IL-6 effects (e.g. synthesis of acute phase proteins) but negatively regulate the expression of this cytokine, thus creating a negative feedback loop during the inflammatory response *in vivo*.⁴⁹⁻⁵¹

Nucleotide variations in the regulatory region of IL-6 genes in recipients and donors may have a strong influence on gene transcription levels and may lead to increased cytokine production and activity. This suggests that nucleotide variations may be a possible risk factor for susceptibility and severity of some diseases, including a-GVHD.⁵² Allelic variants of cytokine genes have been related to high or low cytokine production.⁵³ Our study found an association of the GG genotype in recipients and donors with higher IL-6 levels in children (as compared to CC genotype), which is consistent with other studies.^{40,54} Fishman *et al* reported that healthy donors bearing the GG genotype produced high levels of IL-6, with a circulating concentration approximately twice as high as that in CC homozygotes.⁵⁴ Nevertheless, it is worth noting that these studies have not been carried out in a pediatric population.

Previous studies have indicated that the IL-6 allele G at position -174 in recipients and donors is related to a risk of developing a-GVHD^{30,40,55} and to an increase in its severity after allo-HSCT.³⁰ Karabon *et al* did not find a correlation between the presence of specific genotypes and IL-6 levels in recipients and donors, but observed a tendency for high a-GVHD

frequency among patients with G allele at position -174 in IL-6 promoter region.⁴⁰ Here, we found a relationship between IL-6 genotype and the presence ($P=0.850$, $P=0.256$) or severity ($P=0.256$, $P=0.387$) of a-GVHD in recipients and donors respectively.

Our study showed that children exhibit a different behavior in relation to IL-6 production and kinetics after allo-HSCT as compared to adults. The higher frequency genotype in this group is associated with high IL-6 production. Furthermore, we found that IL-6 peak levels were detected in the first 14 days after transplantation and then stabilized, and that higher IL-6 levels were present in pediatric patients with no a-GVHD ($P=0.001$). This finding can be explained by the activation of the classical signaling pathway, which occurs through the formation of a complex, where IL-6 binds to mIL-6R and gp130, as this pathway is associated with tissue regeneration and anti-inflammatory properties.^{26,56} Future studies are needed to evaluate the expression of mIL-6R (CD126) and gp130 (CD130) to confirm possible anti-inflammatory and regenerative activity in non-a-GVHD pediatric patients. Clarification of the functional role of IL-6 under these conditions is necessary for a better understanding of the molecular inflammatory mechanisms involved and to develop appropriate therapeutic strategies.

We conclude that although pediatric and adult patients presented the same characteristics related to the transplantation procedure, type of HSCT, conditioning regimen, IL-6 genotype frequency and CMV positivity, the pediatric group presented significant differences at the genetic level and in the production of IL-6 after allo-HSCT when compared to adults. Hence, to establish new biomarkers for a-GVHD and to determine the patient's responsiveness to HSCT, it is necessary to further understand the age-related differences reported herein. Future research should focus on the biological, genotypic, clinical and pharmacogenomic characteristics in this group of patients to allow a correlation with the clinical outcomes observed.

FINANCIAL SUPPORT

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

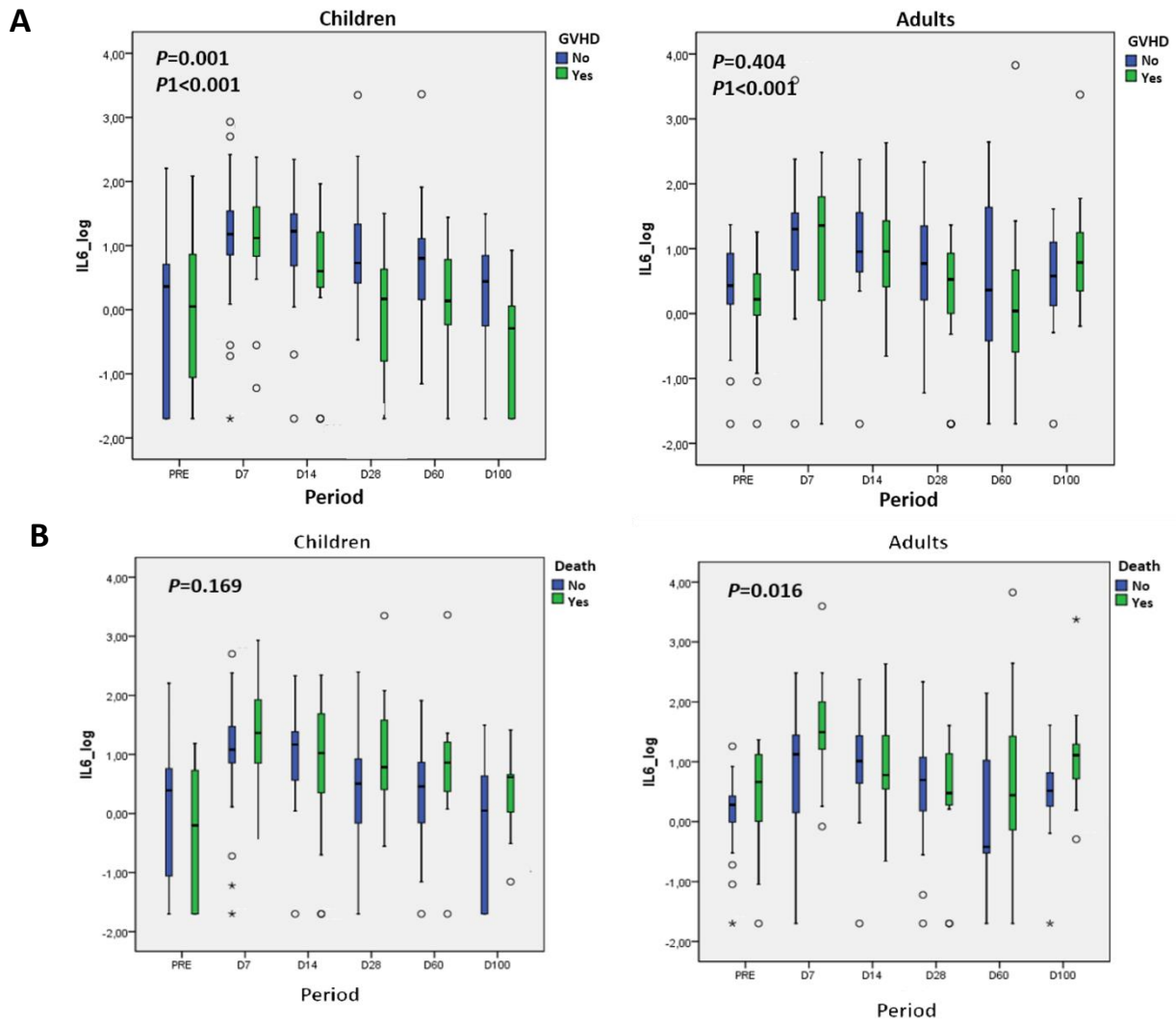


Figure 1: Plasma IL-6 levels in children and adults according to different time points. A) P indicates an association between plasma IL-6 levels and the onset of a-GVHD; and $P1$ indicates an association between plasma IL-6 levels and the follow-up timepoints after allo-HSCT; B) P indicates an association between IL-6 levels and death. $P<0.05$ was considered significant.

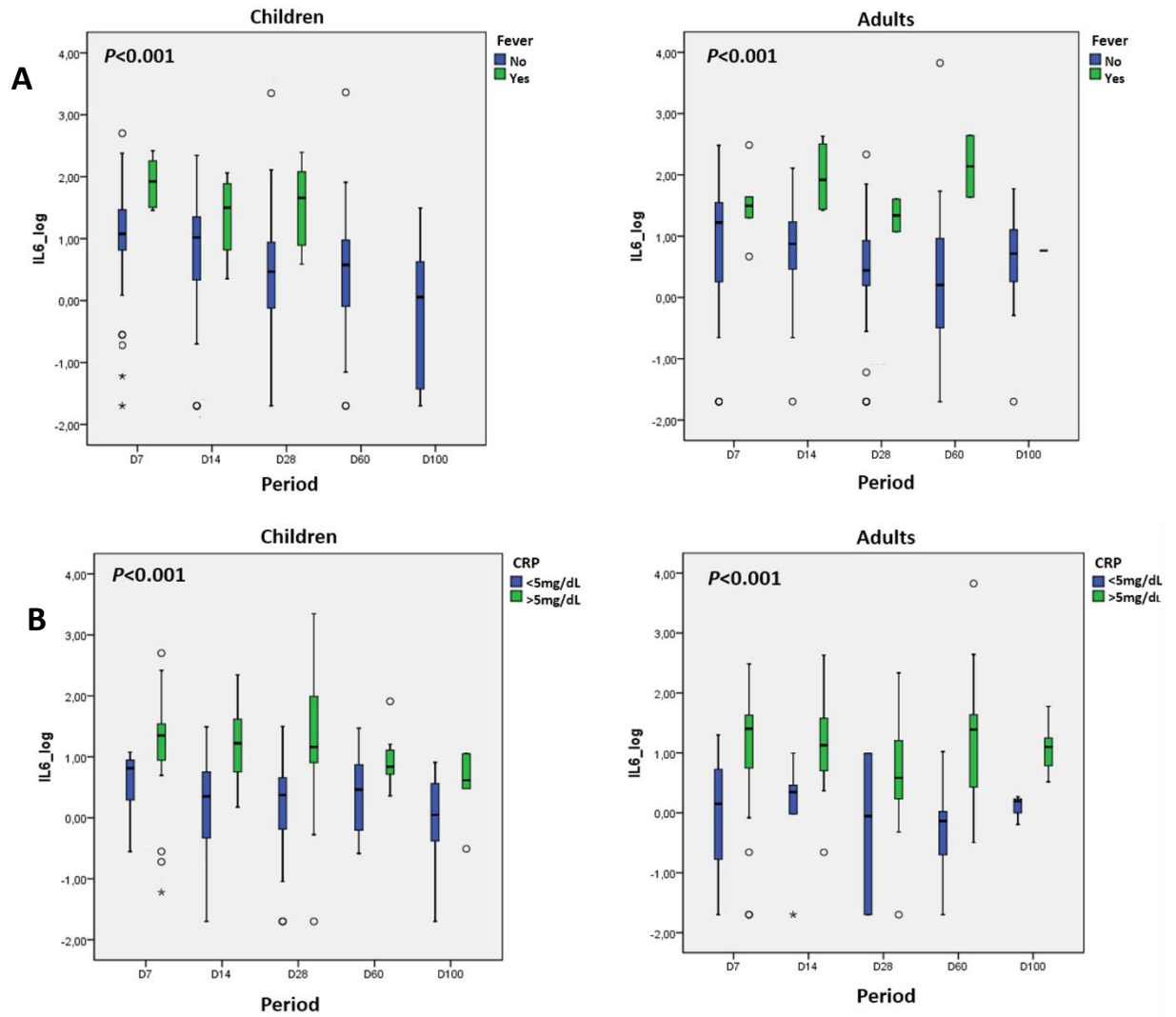


Figure 2: Associations between plasma IL-6 levels in children and adults and A) Fever and B) normal (<5mg/dL) and altered (≥ 5 mg/dL) CRP concentrations. $P < 0.05$ was considered significant.

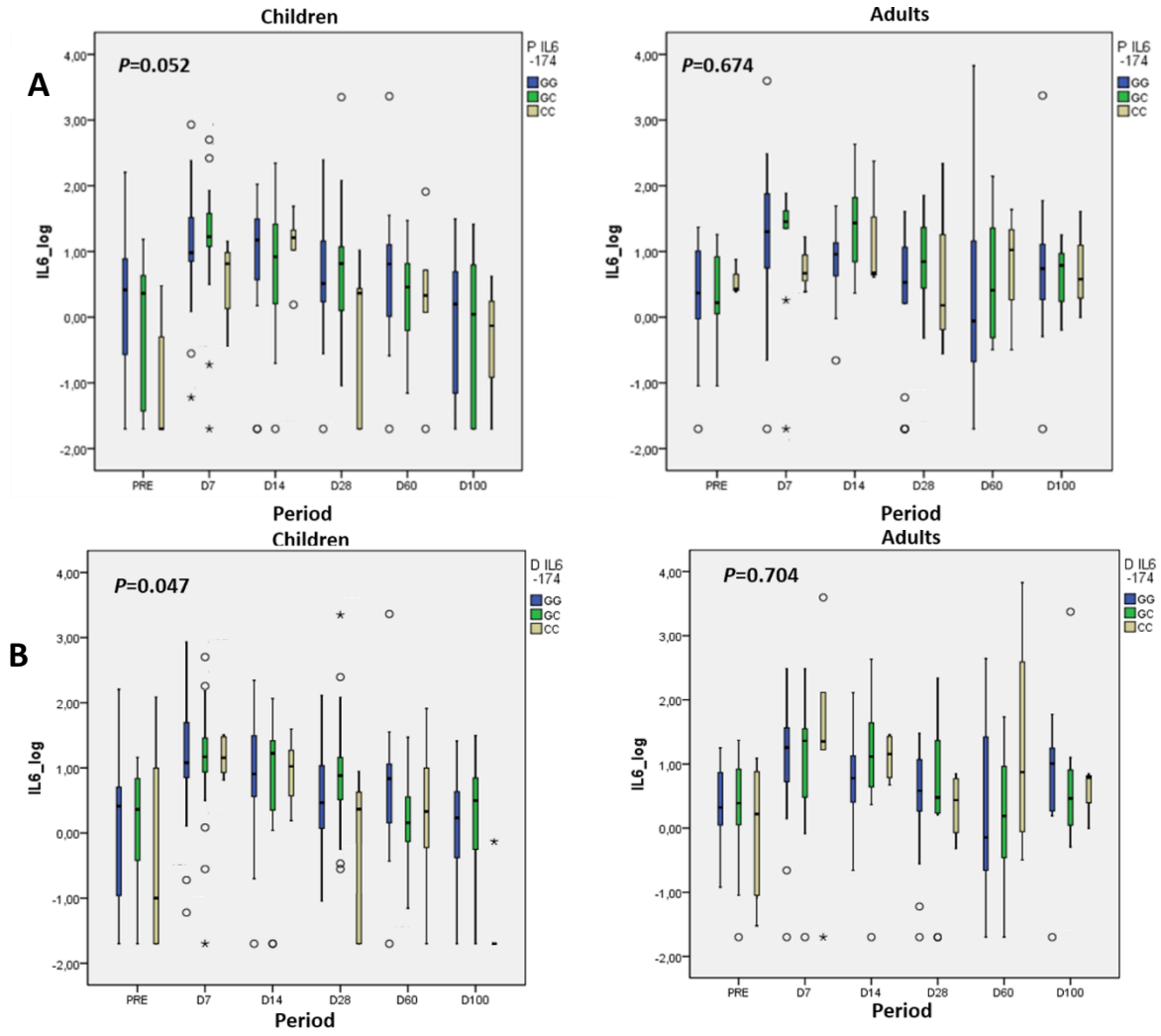


Figure 3. Associations between plasma IL-6 levels in children and adults A) genetic polymorphisms in recipient patients B) and donors. $P < 0.05$ was considered significant.

Tabela 1- Characterization of transplant recipients and donors and a comparative analysis between children (≤ 18 years) and adults (> 18 years).

Characteristics	Total N (%)	Children N (%)	Adults N (%)	<i>P</i> *
Recipients	85 (100)	51 (60.0)	34 (40.0)	
Sex				
Female	37 (43.5)	22 (43.1)	15 (44.1)	0.552
Male	48 (56.5)	29 (56.9)	19 (55.9)	
Age	15 (8.5-31.5)	9.0 (5.5-13.0)	34.5 (26.7-50.5)	
HSCT type				
Related donor	23 (27.4)	9 (18.0)	14 (41.2)	0.053
Haploidentical	22 (26.2)	14 (28.0)	8 (23.5)	
Unrelated donor	38 (45.2)	27 (54.0)	11 (32.4)	
Syngeneic	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (2.9)	
HSC origin				
Bone marrow	63 (84.0)	43 (95.6)	20 (66.7)	0.001
Peripheral blood	11 (14.7)	1 (2.2)	10 (33.3)	
Cord blood	1 (1.3)	1(2.2)	0 (0.0)	
Conditioning regimen				
Myeloablative	43 (51.2)	29 (58.0)	14 (41.2)	0.130
Non-myeloablative	41 (48.8)	21 (42.0)	20 (58.8)	
a-GVHD prophylaxis				
MTX + CSA	23 (27.7)	13 (26.5)	10 (29.4)	0.773
Others	60 (72.3)	36 (73.5)	24 (70.6)	
Use of Antithymoglobulin				
Yes	30 (35.7)	23 (46.0)	7 (20.6)	0.015
No	54 (64.3)	27 (54.0)	27 (79.4)	
a-GVHD				
Yes	34 (40.0)	16 (31.4)	18 (52.9)	0.109
No	51 (60.0)	35 (68.6)	16 (47.1)	
a-GVHD grade				
0-I	69 (81.2)	44 (86.3)	25 (73.5)	0.118
II-IV	16 (18.8)	7 (13.7)	9 (26.5)	
Death				
Yes	32 (37.6)	15 (29.4)	17 (50.0)	0.046
No	53 (62.4)	36 (70.6)	17 (50.0)	
IL-6 -174 polimorphism				
Recipient				
GG	47 (56.6)	28 (56.0)	19 (57.6)	0.816
GC	29 (35.0)	17 (34.0)	12 (36.4)	
CC	7 (8.4)	5 (10.0)	2 (6.1)	
CVM				
Recipient				
Positive	75 (91.5)	43 (87.8)	32 (97.0)	0.143

Negative	7 (8.5)	6 (12.2)	1 (3.0)	
Disorders				
Benign	11 (12.9)	11 (21.6)	0 (0.0)	0.004
Malignant	74 (87.1)	40 (78.4)	34 (100.0)	
Donors				
Sex				
Male	50 (58.8)	28 (62.2)	22 (71.0)	0.430
Female	26 (30.6)	17 (37.8)	9 (29.0)	
CVM Donor				
Positive	69 (84.1)	43 (87.8)	26 (78.8)	0.276
Negative	13 (15.9)	6 (12.2)	7 (21.2)	
IL-6 -174 polymorphism				
Donor				
GG	42 (49.4)	27 (52.9)	15 (44.1)	0.712
GC	31 (36.5)	17 (33.3)	14 (41.2)	
CC	12 (14.1)	7 (13.7)	5 (14.7)	

Legend: HSC: hematopoietic stem cells; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; a-GVHD: acute graft-versus-host disease; a-GVHD grade 0-I (mild) and II-IV (clinically significant); CSA: cyclosporin A; MTX: methotrexate; ATG: antithymoglobulin; CMV: Citomegalovirus. * *P*-value indicates the comparison between children and adult groups.

Table 2. IL-6 levels prior to allo-HSCT and at different follow-up timepoints in recipient patients with or without acute GVHD

Timepoint	IL-6 (pg/mL)			
	Children		Adults	
	Without a-GVHD	With a-GVHD	Without a-GVHD	With a-GVHD
Prior to HSCT	2.30 (0.20-5.19)	1.50 (0.08-7.53)	2.69 (1.12-9.38)	1.66 (0.91-6.46)
D7	15.15 (7.14-35.57)	13.19 (6.68-45.48)	19.98 (3.85-38.62)	22.76 (1.51-70.01)
D14	16.74 (3.55-31.43)	4.00 (1.98-16.37)	9.28 (4.34-43.53)	9.09 (2.32-28.62)
D28	5.46 (2.58-27.41)	1.49 (0.14-4.52)	7.32 (1.62-26.67)	3.38 (0.88-9.19)
D60	6.37 (1.31-14.51)	1.37 (0.53-6.71)	3.05 (0.36-46.12)	1.47 (0.24-6.66)
D100	2.77 (0.52-7.27)	0.58 (0.02-1.77)	3.79 (1.00-12.60)	6.14 (2.05-18.65)

Legend: a-GVHD: Acute graft-versus-host disease. The results are expressed as median and percentiles (P25-P75).

Table 3. IL-6 regulatory gene polymorphisms of recipients and donors and plasma IL-6 levels in children and adult recipients prior to allo-HSCT and at different follow-up timepoints

Timepoint	IL-6 (pg/mL)					
	GG	Children GC	CC	GG	Adults GC	CC
Recipients						
N	28	17	5	19	12	2
Prior to HSCT	2.60 (0.30-7.62)	2.30 (0.03-4.30)	0.00 (0.00-0.50)	2.34 (0.96-9.38)	1.66 (1.13-8.33)	2.67 (2.56-5.12)
D7	9.56 (6.71-32.20)	16.87 (12.00-37.59)	6.53 (3.40-10.41)	19.01 (2.73-65.44)	35.23 (23.01-41.69)	4.66 (3.69-10.70)
D14	14.96 (3.71-31.19)	8.51 (1.77-25.07)	16.21 (10.57-21.18)	7.55 (2.80-13.54)	29.1 (8.06-66.05)	4.71 (4.55-120.99)
D28	3.25 (1.72-14.51)	6.54 (1.26-11.81)	2.32 (0.00-2.72)	3.00 (1.62-10.74)	9.82 (2.76-23.26)	1.51 (01.20-108.62)
D60	6.45 (1.09-12.74)	2.87 (0.66-6.52)	2.14 (1.19-5.20)	1.05 (0.22-7.96)	2.45 (0.49-22.76)	10.57 (8.01-27.02)
D100	1.47 (0.07-4.94)	1.10 (0.17-5.32)	0.74 (0.37-2.44)	5.51 (1.95-12.82)	6.14 (1.75-9.77)	3.79 (3.09-22.31)
Donors						
N	27	17	7	15	14	5
Prior to HSCT	2.57 (0.11-4.80)	2.30 (0.38-6.82)	0.25 (0.00-8.61)	2.10 (1.14-7.44)	2.28 (1.09-10.31)	2.05 (0.48-6.29)
D7	12.03 (7.11-46.59)	14.79 (8.65-28.77)	14.29 (8.49-29.98)	18.05 (26.49-37.17)	26.43 (2.73-45.65)	19.63 (7.68-103.47)
D14	8.05 (3.63-31.19)	16.74 (2.25-26.09)	10.57 (3.73-18.69)	6.01 (2.56-13.49)	9.95 (4.41-27.64)	25.27 (8.06-28.62)
D28	2.93 (1.22-9.70)	7.62 (3.25-14.51)	2.32 (0.00-4.68)	3.83 (1.85-11.76)	32.97 (1.69-17.42)	4.88 (1.51-7.00)
D60	6.82 (1.62-11.52)	1.44 (0.78-3.39)	2.14 (0.81-12.09)	0.77 (0.24-20.56)	0.89 (0.35-6.51)	10.57 (2.45-22.76)
D100	1.71 (0.342-4.31)	3.27 (0.57-86.80)	0.00 (0.00-0.00)	10.15 (1.86-17.68)	32.24 (1.29-8.90)	4.96 (3.09-6.35)

Legend: IL-6 - interleukin 6; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation. The results are expressed as median and percentiles (P25-P75).

REFERENCES

1. Passweg, J. R. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: More than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 786–792 (2016).
2. Hill, G. R. *et al.* Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. *Blood* **90**, 3204–3213 (1997).
3. Xun, B. C. Q., Thompson, J. S., Jennings, C. D., Brown, S. A. & Widmer, M. B. Effect of Total Body Irradiation, Busulfan-Cyclophosphamide, or Cyclophosphamide Conditioning. *Blood* **83**, 2360–2367 (1994).
4. Ferrara, J. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin. Hematol.* **43**, 3–10 (2006).
5. Burman, A. C. *et al.* IFN γ differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood* **110**, 1064–1072 (2007).
6. Teshima, T. *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* **8**, 575–581 (2002).
7. Fujii, N. *et al.* Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 881–885 (2006).
8. Ball, L. M. & Egeler, R. M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant.* **41**, S58–S64 (2008).
9. Appelbaum, F. R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* **411**, 385–389 (2001).
10. Visentainer, J. E. *et al.* Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **31**, 1044–1050 (2003).
11. Holler, E. *et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 1011–1016 (1990).
12. Schots, R. *et al.* Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* **17**, 1150–1156 (2003).
13. Imamura, M. *et al.* Effects of Interleukin-6 on Hematopoiesis in Allogeneic and Syngeneic Bone Marrow Chimeras. *Immunobiology* **191**, 21–37 (1994).
14. Mohty, M. *et al.* Brief report Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **106**, 4407–4411 (2005).
15. Nakamura, H. *et al.* Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN- γ in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, S45–S50 (2000).
16. Kayaba, H. *et al.* Serum markers of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, S40–S44 (2000).
17. Andersen, J. *et al.* Differential effect of conditioning regimens on cytokine responses during allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 635–640

- (2006).
18. Fujita, A. *et al.* Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *J. Infect.* **57**, 241–248 (2008).
 19. Min, C. K. *et al.* The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF- α , IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **28**, 935–940 (2001).
 20. Toubai, T. *et al.* Role of Cytokines in the Pathophysiology of Acute Graft-Versus-Host Disease (GVHD) – “ Are Serum/Plasma Cytokines Potential Biomarkers for Diagnosis of Acute GVHD Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (Allo-HCT)? *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7**, 229–239 (2012).
 21. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243–1254 (1995).
 22. Nishimoto, N. & Kishimoto, T. Interleukin 6: From bench to bedside. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 619–626 (2006).
 23. Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Cell stimulatory. *Adv. Immunol.* **54**, 1–78 (1993).
 24. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
 25. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
 26. Scheller, J., Garbers, C. & Rose-John, S. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin. Immunol.* **26**, 2–12 (2014).
 27. Kaly, L. & Rosner, I. Tocilizumab - A novel therapy for non-organ-specific autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **26**, 157–165 (2012).
 28. Jordan, S. C. *et al.* Interleukin-6, A cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection: Therapeutic implications of IL-6 receptor blockade. *Transplantation* **101**, 32–44 (2017).
 29. Barak, V., Levi-Schaffer, F., Nisman, B. & Nagler, A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk. Lymphoma* **17**, 169–173 (1995).
 30. Cavet, J. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* **98**, 1594–1600 (2001).
 31. Socie, G. *et al.* Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* **72**, 699–706 (2001).
 32. Abdallah, A. N. *et al.* Plasma cytokines in graft vs host disease and complications following bone marrow transplantation. *Hematol. Cell Ther.* **39**, 27–32 (1996).
 33. Terry, C. F., Loukaci, V. & Green, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 18138–18144 (2000).
 34. Ho, L. J., Luo, S. F. & Lai, J. H. Biological effects of interleukin-6: Clinical applications in autoimmune diseases and cancers. *Biochem. Pharmacol.* **97**, 16–26 (2015).

35. Glucksberg, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from hl-a-matched sibling donors1. *Transplantation* **18**, 295–304 (1974).
36. Paczesny, S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood* **121**, 585–594 (2013).
37. Glazer, M. *et al.* Use of fiberoptic bronchoscopy in bone marrow transplant recipients. *Acta Haematol* **99**, 22–26 (1998).
38. Hirano, T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**, 17–22 (1992).
39. Xing, Z. *et al.* Il-6 is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. *J. Clin. Invest.* **101**, 311–320 (1998).
40. 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.* **66**, 700–710 (2005).
41. Chen, X. *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T cell reconstitution and attenuates the severity of graft versus host disease. *Blood* **114**, 891–901 (2009).
42. Tawara, I. *et al.* Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Cancer Res.* **17**, 77–88 (2011).
43. Tárnok, A., Hamsch, J., Chen, R. & Varro, R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin. Chem.* **49**, 1000–1002 (2003).
44. Jani, I. V., Janossy, G., Brown, D. W. G. & Mandy, F. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 243–250 (2002).
45. Tárnok A, Hamsch J, C. R. *et al.* Cytometric Bead Array to Measure Six Cytokines in “. *Clin. Chem.* **49**, 1000–1002 (1807).
46. Chen, Y. *et al.* Infusion-related febrile reaction after haploidentical stem cell transplantation in children is associated with higher rates of engraftment syndrome and acute graft-versus-host disease. *Pediatr. Transplant.* **19**, 918–924 (2015).
47. Damas, P. *et al.* Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* **215**, 356–362 (1992).
48. Reddy, P. & Ferrara, J. L. M. *Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Leukemia Responses.* *Hematology*, Elsevier Inc., 1640-1688 (2018).
49. Ray, A., LaForge, K. S. & Sehgal, P. B. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5736–5746 (1990).
50. Ray, A., LaForge, K. S. & Sehgal, P. B. Repressor to activator switch by mutations in the first Zn finger of the glucocorticoid receptor: is direct DNA binding necessary? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7086–7090 (1991).
51. Ray, A., Prefontaine, K. E. & Ray, P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 12940–12946 (1994).

52. Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas, S. C. & Chrousos, G. P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann. Intern. Med.* **128**, 127–137 (1998).
53. Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J. H. & Hutchinson, I. V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum. Immunol.* **61**, 863–866 (2000).
54. Fishman, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1369–1376 (1998).
55. Mullighan, C. G. & Bardy, P. G. Advances in the genomics of allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. *Drug Dev. Res.* **62**, 273–292 (2004).
56. Tvedt, T. H. A., Ersvaer, E., Tveita, A. A. & Bruserud, Ø. Interleukin-6 in allogeneic stem cell transplantation: Its possible importance for immunoregulation and as a therapeutic target. *Front. Immunol.* **8**, 1–15 (2017).

7 ARTIGO 2

IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10 gene polymorphisms in allogeneic HSCT recipients with a-GVHD

The effects of gene polymorphisms on susceptibility to acute GVHD and survival of allogeneic HSCT recipients: IL-10 gene polymorphisms as a more accessible target to predict prognosis

Mariela Granero Farias^{1,2}, Camila Andrade dos Santos², Bruna de Mello Vicente³, Muriel Habigzang³, Iuri Vicente Camargo Morkis^{1,2}, Priscila de Oliveira da Silva², Natália Emerim Lemos², Cristine Dieter², Alessandra Paz², Liane Esteves Daudt^{1,2,3}

1 Graduate Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

2 Hospital de Clínicas de Porto Alegre/HCPA

3 Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

Corresponding author:

Mariela Granero Farias, M.Sc.

Specialized Diagnostic Unit, Flow Cytometry

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

Porto Alegre, Brazil

90035-903

Phone +55 51 33597779

E-mail: mgfarias@hcpa.edu.br.

ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a therapeutic modality commonly used to treat hematological and immunological disorders. Among the main complications of allo-HSCT is the acute graft-versus-host disease (a-GVHD), a condition which accounts for a high incidence of mortality. Several genes encoding inflammatory mediators (e.g., cytokines) may present polymorphisms, which have been implicated in the risk of developing GVHD. Variations in a single nucleotide, also known as single-nucleotide polymorphisms (SNP), can directly influence cytokine secretion and function and thereby play an important role in the pathogenesis of a-GVHD. In our study, we investigated the association between genotypes, alleles and haplotypes of cytokine-encoding genes and the incidence and severity of GVHD and survival of HSCT recipients. No association was found between *IL-6* -174 G/C, *INF- γ* +874 T/A, *TNF- α* -238 A/G, -308 A/G and *IL-10* -819 C/T, -592 A/C polymorphisms and the presence or severity of a-GVHD. Nevertheless, the AA genotype of *IL-10* at position -1082 was associated with the absence of a-GVHD and thus presented a protective effect, whereas the GG genotype was associated with a higher risk of developing a-GVHD. *IL-10* is a potent suppressor of the immune response which can be useful in preventing GVHD. The *IL-10* -1082 genotype can be used as a prognostic determinant to predict which HSCT recipient will be more responsive to the transplant. Thus, cytokine gene assays may be useful in the individualization of prophylactic regimens and for an appropriate selection of immunosuppressants based on the HSCT recipient's responsiveness. Our results may contribute to a better understanding of the effect of cytokine genotypes on the development of GVHD.

Keywords: Cytokine gene polymorphism, allogeneic stem cell transplantation, interleukin, graft-versus-host disease.

1 INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) has been used to treat various hematological, metabolic, and immunodeficiency diseases.¹ Despite the extensive progress of allo-HSCT protocols achieved so far, the recipient's post-transplant survival rate is as low as 50-68% according to the literature.^{2,3} The transplant prognosis depends on many factors such as the underlying disease, the type of conditioning regimen and the characteristics of recipients and donors. Acute graft-versus-host disease (a-GVHD) and infections are the leading causes of morbidity and mortality in HSCT patients.⁴

GVHD is a major complication following allo-HSCT whose acute form occurs in 40 to 60% of recipients, even in cases where the recipient and donor are HLA-compatible.^{5,6} The pathophysiology of GVHD involves a "cytokine storm" induced by the pre-transplant conditioning regimen, with a massive release of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-2 (IL-2). Other cytokines, such as interleukin 10 (IL-10), are responsible for modulating the effect of inflammatory mediators. This process is amplified by the activation of transplanted donor T cells and host tissue damage caused by a direct effect of cytokines and toxic effects of the conditioning regimen, ultimately leading to apoptotic cell death.⁷

Cytokines are gene-encoded products involved in an extensive network of synergistic and antagonistic interactions that may exhibit either a positive or negative regulatory effect on several cell types.⁸ Nucleotide variations in the regulatory region of the genes encoding these proteins have a strong influence on the susceptibility to, and severity of, several diseases. Recent evidence has demonstrated the role of polymorphisms in inflammatory genes, both in recipients and donors, in the occurrence of GVHD.⁸ Mounting evidence has proven the role of cytokine gene polymorphisms, such as *TNF- α* , *IL-10*, *IL-6* and *INF- γ* , in the prognosis of HSCT,

specifically in the risk for a-GVHD, transplant-related mortality and infections.^{1,9} Despite this, the prognostic importance of each gene polymorphism remains conflicting in the literature, probably due to demographic differences in the studied populations.

IL-6 is a proinflammatory cytokine whose production is affected by a functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region at position -174 (G/C). Ambruzova et al shown that the *IL-6* -174 G allele of transplant recipients and donors is associated with an increased risk of developing a-GVHD.¹⁰ TNF- α is a potent immunomodulatory and inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. There are studies showing an association of TNF- α with the transplant prognosis and the risk of a-GVHD.^{11,12} INF- γ also plays a central role in the immune and inflammatory response and is secreted by T lymphocytes, Natural Killer (NK) cells and antigen-presenting cells (APC).¹³ The role of INF- γ polymorphisms in the development of GVHD has been extensively investigated.^{14,15}

IL-10 may work as a stimulatory or inhibitory mediator of various effects on GVHD.¹⁶ It is produced by B cells,¹⁷ regulatory T cells (T Regs),¹⁸ monocytes,¹⁹ and dendritic cells.²⁰ This cytokine is of particular interest due to the influence of its genetic polymorphisms on the incidence and prognosis of GVHD and on the survival of HSCT recipients.^{21,22} The IL-10 gene located on chromosome 1 (1q31-1q32) presents three SNPs in the promoter region at positions -1082, -819, and -592, which affect IL-10 transcription, production and secretion.²³ IL-10 suppresses the adaptive immune response²⁴ and plays an important role in the inhibition of TNF- α and INF- γ , production of Th1 cells, and T cell proliferation.¹⁶ A meta-analysis suggests that the allele A at position -592, the allele T at position -819, and the allele A at position -1082, are associated with a reduced risk for a-GVHD.²⁵

Due to the detrimental clinical effects of GVHD, there is a great interest in finding mechanisms capable of suppressing the disease development and in creating predictive

laboratory tests to address this issue. In recent years, non-HLA genotypes have been studied because of their role in the occurrence and severity of GVHD as well as because of their contribution to transplant-related mortality, infectious episodes and impacted overall survival (OS). The use of a simple genetic test capable of predicting the risk of GVHD or other complications may have great benefits in the field of transplantation medicine, such as implications for donor selection, recipient treatment, and clinical trial design and outcomes of new immunosuppressive agents. Consequently, cytokine polymorphisms may be a useful prognostic indicator of post-transplant complications and immunosuppression.²⁶

The presence of polymorphisms in cytokine genes is variable among different populations. The Brazilian population is composed of genetically heterogeneous groups, mainly Europeans, Amerindians and Africans. In addition, Brazil is a developing country with large socioeconomic differences. Studies have shown that socioeconomic factors play a relevant role in the clinical prognosis, affecting mortality rates of different hematological malignancies and allo-HSCT.²⁷ The ethnic diversity, socioeconomic disparities and the existence of few studies in southern Brazil have reinforced the need to study gene polymorphisms in this population, as well as to investigate their impact in the field of HSCT.²⁸ This study aimed to evaluate the contribution of gene polymorphisms in the regulatory region of the cytokine-encoding genes *TNF- α* (-308 A/G, -238 A/G), *IL-6* (-174 G/C), *IL-10* (-1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C), and *INF- γ* (-874 T/A) to the incidence and severity of GVHD and to the survival of allo-HSCT recipients.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study population

The study population consisted of 99 allo-HSCT recipients and their respective donors from April 2015 to April 2018. The southern region of Brazil is composed of a genetically mixed population, with 82% white European (Italians, Germans, Portuguese and Spanish) and 8% mestizos (African and indigenous).²⁹ Bone marrow or peripheral blood samples from recipients and their respective donors were obtained prior to infusion. Busulfan/cyclophosphamide (BuCy), total body irradiation (TBI) or Busulfan/cyclophosphamide/etoposide were used in the myeloablative conditioning regimen, whereas combinations of Fludarabine/Busulfan/Melphalan were used in the non-myeloablative regimen. Post-transplant cyclophosphamide was administered to haploidentical transplant recipients. Prophylaxis of a-GVHD consisted of a combination of Cyclosporin A with methotrexate or mycophenolate mofetil (MMF). The presence or absence of GVHD was diagnosed clinically (with or without histopathological confirmation) following the classification of Glucksberg et al.³⁰ GVHD grading (0-IV) was categorized into mild (0-I) or clinically significant grades (II-IV).³⁰ An association between *IL-10*, *IL-6*, *TNF- α* , *INF- γ* gene polymorphisms and the incidence of GVHD, cause of death, overall survival (OS) and GVHD-free survival, was investigated. This study was approved by the research ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under protocol number 14-0607. All transplant recipients, their legal guardians and donors who participated in the study signed an informed consent form.

2.2 HLA typing

For related transplants, low-resolution HLA typing was performed serologically for HLA-A, -B and -DRB1 using the Luminex Labscan 100 analyzer (Luminex Corp., Austin, TX, USA). For unrelated transplants, high-resolution HLA typing using molecular typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 was performed in the ABI 3500 XL Dynal sequencer (Applied Biosystems, New York, USA).

2.3 Molecular analysis

Bone marrow or peripheral blood samples were collected into K₂EDTA from recipients and donors prior to HSCT. The DNA was extracted using the iPrep purelink™ gDNA blood kit in the iPrep™ Purification Instrument (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA). DNA samples were quantitated in the Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CS, USA), diluted to 20 mM and frozen at -80 °C for further reaction. Custom primers were used to identify polymorphisms in the promoter region of *IL-6* -174 G/C (rs1800795); *INF-γ* +874 T/A (rs2430561); *TNF-α* -308 A/G (rs1800629), -238 A/G (rs361525); *IL-10* -1082 A/G (rs1800896), -819 C/T (rs1800871) and -592 A/C (rs1800872). A detailed description of the gene polymorphisms analyzed herein is shown in Table 1. An allelic discrimination assay was performed by Real-Time PCR on Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and analyzed in Step One software version 2.3.

2.4 Statistical analysis

Allelic frequencies were calculated by gene counting, and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) deviations were analyzed using χ^2 tests. Allelic and genotypic frequencies were compared between the groups (with or without a-GVHD) by χ^2 tests. In addition, genotypes were grouped into different inheritance patterns (additive, recessive, and dominant) and compared among the samples.^{31,32} The data were analyzed in SPSS version 18.0. Median, P25 and P75 percentiles were used for descriptive analysis. Overall Survival (OS) was defined by the time since hematopoietic stem cell infusion (HSC) at death; GVHD-free survival was measured from the HSC infusion to the first episode of GVHD, whereas disease-free Survival (DFS) was determined by the time since HSC infusion to the relapse of the disease. The OS, GVHD-free survival and DFS were calculated using the Kaplan-Meier method, and differences in the distribution function between time and event were compared by the log-rank test. The haplotypes constructed with the combination of the three *IL-10* polymorphisms and their frequencies were inferred using the PHASE 2.0 program through a Bayesian statistical method.³²

3 RESULTS

3.1 Clinical outcomes

Bone marrow or peripheral blood samples were obtained from 99 patients allo-HSCT recipients (58 males and 41 females), with a median age of 15 years (P25: 9.0 years; P75: 33.0 years), and from their corresponding donors (64 males and 32 females), with a median age 31 years (P25: 22.0 years; P75: 39.0 years). The transplant recipients had the following underlying diseases: acute lymphoid leukemia (n=32), acute myeloid leukemia (n=23), myelodysplastic

syndrome (n=11), lymphoma (n=7), genetic diseases (n=6), immunodeficiency (n=6), aplasia (n=4), other conditions (n=4), chronic myeloid leukemia (n=3), hemoglobinopathies (n=2), and multiple myeloma (n=1).

Thirty-six (37.5%) recipients developed a-GVHD and 37 (37.4%) died. The most common cause of death was sepsis. The following a-GVHD grades were considered for the statistical analysis: mild grade 0-I (n=72) and clinically significant grade II-IV (n=22). The characteristics of the transplant recipients and procedures are shown in Table 2.

3.2 Association between gene polymorphisms and acute GVHD

Table 3 shows the genotypic and allelic frequencies of *IL-6* -174, *INF- γ* +874, *TNF- α* -238 and -308, *IL-10* -592 and -819 polymorphisms in transplant recipients and donors. The genotypic distributions of the seven polymorphisms analyzed were concordant with those predicted by the Hardy-Weinberg Equilibrium in both groups ($P \geq 0.05$) and were similar between recipients and donors.

As shown in Table 4, no significant association was found between the genotypic and allelic frequencies of *IL-6* -174, *INF- γ* +874, *TNF- α* -238 and -308 among recipients with or without a-GVHD ($P > 0.05$). There was no influence of the presence of gene polymorphisms on the severity of a-GVHD. The AA genotype of *IL-10* -1082 was more frequent in transplant recipients without a-GVHD (68.1%), which suggests that this genotype may play a protective role against a-GVHD. In contrast, the GG genotype (77.8%) of *IL-10* -1082 was associated with an increased risk for a-GVHD ($P = 0.031$). The recessive model of the analysis of inheritance patterns indicated that the G allele was associated with the presence of a-GVHD, which confirms the genotypic findings ($P = 0.024$) (Table 5). In transplant recipients, the most frequent *IL-10* haplotype (defined by polymorphism at positions -1082, -819 and -592) was ACC (36.4%),

followed by GCC (29.1%) and ATA (29%). The analysis of *IL-10* haplotypes showed that the presence of 4 to 6 mutated alleles is associated with a higher risk of developing a-GVHD (P=0.010). No significant association was observed for the donors' samples (P=0.433).

3.3 Association between gene polymorphisms and GVHD-free survival and disease-free survival

The GVHD-free survival was 58% in 105 days (95% CI: 94.37-117.11%). There was no difference between the recipients' genotypes and their GVHD-free survival. Only the GG genotype of *IL10* -1082 differed from the AA and AG genotypes. A total of 22.2% of the recipients with the GG genotype did not develop the disease, with an estimate of 56.3 days (95% CI: 29.8-82.7). In contrast, 68.1% and 65% of the recipients with the genotypes AA and AG developed a-GVHD, with estimates of 111.0 days (95% CI: 97.8-127.3) and 110.3 days (95% CI: 92.9-127.6), respectively. No significant difference was observed between the donors' genotypes and the recipients' GVHD-free survival (Figure 1). Among 53 patients with malignant diseases, 88% had a DFS with an estimated 971 days (95% CI: 864.6-1077.7).

3.4 Association between gene polymorphisms and overall post-transplant survival

There was no significant difference between the OS and the presence of *IL6* -174, *INFγ*-874, *TNFα* -238, *TNFα* -308, *IL10* -1082 in recipients and donors, and *IL10* -592 and *IL10* -819 in donors. The OS was 51.0%, with an estimated 24 months (95% CI: 20.5-30.0). Transplant recipients bearing the *IL10* -819 CC genotype showed a protective effect, in which 62.3% of the patients remained alive, with an estimated 27.5 months (95% CI: 23.1-32.0); in contrast, the TT genotype (P =0.010) was associated with more deaths (Figure 2A). The *IL10* -592 CC genotype

also had a protective effect, in which 75.0% of the patients remained alive, with an estimated 28.5 months (95% CI: 23.6-32.7) as compared to the AA genotype (P=0.022), which was associated with more deaths (Figure 2B).

4 DISCUSSION

While allo-HSCT is a procedure that preserves the lives of patients bearing several fatal diseases, mature T cells in the graft can initiate immune reactions and cause a-GVHD. Despite the recent advances in supportive care, a-GVHD remains a serious complication leading to high mortality of HSCT recipients.³³

Cytokines and other regulators of the immune response are considered as risk factors for a-GVHD as they play an important role in the disease development. The description of genetic polymorphisms within the regulatory sequence of cytokine-producing genes has helped elucidating their role in the inflammatory process. Variations in nucleotides in coding genes can affect the secretion or function(s) of the corresponding proteins. In fact, several authors have shown that gene polymorphisms may be responsible for the phenotypic variation which has been associated with various diseases,³⁴ transplant prognosis^{12,14,35-39} and a-GVHD onset.⁶

In our study, we evaluated the relationship between *IL-6*, *TNF- α* , *INF- γ* and *IL-10* gene polymorphisms and the incidence and severity of a-GVHD and post-transplant survival in a population in southern Brazil. The distribution of genotypes was similar to that found in other Brazilian studies⁴⁰ and in other countries.^{4,41-43} However, some authors did find differences in the frequency of *IL-6* and *IL-10* genotypes.^{4,42,44-48}

There was no statistically significant association between *IL-6*, *INF- γ* and *TNF- α* genotypes and the presence or severity of a-GVHD and survival following allo-HSCT. The studies addressing these gene polymorphisms are conflicting in the literature,^{10,12,22,49-51} because

of the lack of uniformity, in particular: heterogeneity of the study population, sample size, conditioning regime used, type of donor, source of cells, and transplant type. *IL-6* polymorphism studies have shown that the homozygous GG genotype both in recipients^{5,10,52} and donors^{6,49,51} is associated with an increased risk for a-GVHD following allo-HSCT. Ambruzova et al. reported that transplant recipients that had the *IL-6* G allele had a borderline significant decrease in OS as compared to recipients with the homozygous CC genotype.⁵² Polymorphisms in the *TNF- α* gene at positions -238 and -308 were found to influence the allo-HSCT prognosis.^{53,54} Although *TNF- α* plays a significant role in the pathogenesis of a-GVHD and has been associated with the disease in some studies,^{12,55} several authors have not consistently found any association between *TNF- α* polymorphisms and the risk of a-GVHD,^{37,56–58} transplant prognosis and OS. The data are also conflicting with *INF- γ* +874. While some studies show an association between the microsatellite alleles of *INF- γ* and a-GVHD,^{14,59} others have found no direct association with the disease risk.²⁶

Previous studies have found an association between *IL-10* gene polymorphism at position -592 and a low risk for a-GVHD.^{21,60–63} Gan et al. obtained similar results although they did not find a significant association.⁴ It has also been described that homozygous C allele recipients present low *IL-10* production and have a high incidence of a-GVHD.^{56,59,60} In other studies, the correlation between the -592 genotype and the risk for a-GVHD was not established.^{38,39,61,62,68–71}

Zhu et al. reported that the presence of the T allele in *IL-10* at position -819 is associated with a reduced risk of developing a-GVHD.^{25,61,72} Some studies, including a meta-analysis by Cho et al. (2015), have shown that the genotype CC of *IL10* -819 in transplant recipients and donors is associated with an increased risk for a-GVHD.^{49,64–67} In other studies, however, no correlation was found between the -819 genotype and the risk for a-GVHD.^{38,39,61,62,69–71}

A meta-analysis showed an association of the *IL-10* -1082 polymorphism with a reduced risk of a-GVHD,²⁵ while other authors showed a correlation with an increased risk^{49,61,68} and

several others did not find any association.^{4,6,27,36,37,57,62-65,67,68} No relationship was found between *IL10* -1082 polymorphism and the OS.⁷² Our study found an association between the AA genotype of *IL-10* -1082 and the absence of a-GVHD, which is in line with the study by Zhu et al.²⁷ We also observed an association of the GG genotype with the presence of a-GVHD (P=0.031). The analysis of the haplotypes of the three nucleotide exchange positions showed that the presence of 4 to 6 mutated alleles is associated with a high risk of developing a-GVHD (P=0.010). As for the OS, transplant recipients who had the CC genotype of *IL-10* at positions -819 and -592 had a protective effect, with fewer deaths than those with the TT and AA genotypes, respectively.

There is no consensus in the literature on which genotype^{22,23,38,62,65} or haplotype^{23,73,74} is associated with a high production of IL-10. Consistent with our findings, Li et al. observed that the AA genotype is associated with a protective effect against a-GVHD.^{22,65} It is known that IL-10 secreted by APCs promotes the development of immunological tolerance and suppresses the production of other inflammatory cytokines. IL-10 modulates the expression of the major histocompatibility complex and costimulatory molecules such as CD80 in the APC, thereby attenuating the allo-reactive response of T cells.⁷⁵ IL-10 also suppresses various immune response activities by inhibiting proinflammatory T-helper lymphocytes (Th1) and the production of TNF- α and INF- γ , while stimulating the proliferation and differentiation of Th2 cells and B cells. These biological characteristics explain the role of IL-10 as a suppressive mediator involved in the prevention of a-GVHD and in inducing HSCT tolerance.^{12,66} A limitation of our study was the lack of quantification of plasma IL-10 levels to assess the association of the genotypes with cytokine production to confirm the hypotheses.

Although the *IL-10* genotype is protective against a-GVHD, this may be disadvantageous for patients with hematological malignancies, as a-GVHD is closely associated with the graft-versus-leukemia effect. This condition occurs when donor T cells recognize foreign

histocompatibility antigens in the underlying disease cells and destroy them. Once the increased IL-10 production induces tolerance to these antigens, the system may fail to eradicate the residual neoplasia.⁶¹ Thus, while a good genotype may prevent the deleterious effects of a-GVHD, it may likewise be detrimental to some patients by causing the graft-versus-leukemia effect.⁷⁰ In our study, only 11.3% of the 53 patients with malignant diseases had relapse of the initial disease, and no association was found between the recipients' and donors' *IL-10* -1082 genotype and the disease free survival (DFS).

The genetic analysis may be an important biomarker tool to predict the risk of a-GVHD. When we tested the association between *IL-10* haplotypes and the presence of a-GVHD, we found that the occurrence of 4 to 6 mutated alleles resulted in a high risk of developing the disease.

Like any other genetic association study, the analysis of polymorphisms is susceptible to numerous confounding factors, which include sample size, study power, population heterogeneity (age, ethnicity, diagnosis and disease grading), characteristics of the transplant (HLA, GVHD grading, cell origin, intensity of the conditioning regimen, prophylaxis of GVHD and T-cell depletion), as well as the use of anti-cytokine therapies. Clinical studies are recommended to address these issues, since the knowledge of genetic markers is relevant for understanding the pathogenesis and progression of a-GVHD.

In summary, our results showed that the analysis of the *IL-10* genotype can be used as an indicator of prognosis to predict which patient will respond better to treatment. The AA genotype of *IL-10* at position -1082 plays a protective role whereas the GG genotype is associated with a high risk for the development of a-GVHD. It is important that each HSCT Center knows the frequency of polymorphisms in the assisted population and implements a genetic screening for the most impacting polymorphisms associated with a greater risk of developing a-GVHD. This may contribute to a better understanding of the effects of gene polymorphisms on the

development of the disease. Thus, cytokine-encoding gene assays may be useful indicators of post-transplant complications, individualization of prophylactic regimens, appropriate selection of immunosuppressive therapy, and development of novel cell-targeted therapies.

FINANCIAL SUPPORT

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

REFERENCES

- 1 Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant* 2008; **41**: S58–S64.
- 2 Gan GG, Teh A, Chan LL, Cheong SK, Chang KM, Ibrahim HM. Bone marrow and stem cell transplantation: Malaysian experience. *Bone Marrow Transplant* 2008; **42**: Suppl 1:S103–S105.
- 3 Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, Bredeson C, Hubsch L, Howson-jan K *et al.* Plenary paper A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; **100**: 1525–1531.
- 4 Gan GGG, Leong YCC, Bee PCC, Chin EFMFM, Abdul Halim H, Nadarajan VSS *et al.* Influence of genetic polymorphisms of cytokine genes in the outcome of HLA-matched allogeneic stem cell transplantation in a South East Asian population. *Cytokine* 2016; **78**: 55–61.
- 5 Socie G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E *et al.* Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001; **72**: 699–706.
- 6 Mullighan C, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes T *et al.* Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004; **77**: 587–596.
- 7 Reddy P, Ferrara JLM. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003; **17**: 187–194.
- 8 Chien JW, Zhang XC, Fan W, Wang H, Zhao LP, Martin PJ *et al.* Evaluation of published single nucleotide polymorphisms associated with acute GVHD. *Blood* 2012; **119**: 5311–5319.
- 9 Dickinson AM, Holler E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; **21**: 149–164.
- 10 Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Faber E, Onderkova J, Kriegova E *et al.* Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. *Int J Immunogenet* 2008; **35**: 401–403.
- 11 Holler E, Kolb HJ, Möller a, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H *et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990; **75**: 1011–1016.
- 12 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 Transpl* 2000; **26**: 1317–1323.
- 13 Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; **22**: 556–560.

- 14 Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PRA, Jackson GH, Middleton PG. Interferon- α and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001; **98**: 1594–1600.
- 15 Middleton PG, Cullup H, Dickinson AM, Norden J, Jackson GH, Taylor PRA *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **30**: 223–228.
- 16 Moore KW, O’Garra A, Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 165–190.
- 17 Rowe V, Banovic T, Macdonald KP, Kuns R, Don AL, Morris ES *et al.* Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2006; **108**: 2485–2492.
- 18 Tawara I, Sun Y, Liu C, Toubai T, Nieves E, Evers R *et al.* Donor- but not host-derived interleukin-10 contributes to the regulation of experimental graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol* 2012; **91**: 667–675.
- 19 Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med* 2002; **196**: 389–399.
- 20 Markey K a, Banovic T, Kuns RD, Olver SD, Don ALJ, Raffelt NC *et al.* Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood* 2009; **113**: 5644–5649.
- 21 Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Grogan B, Chen PJ *et al.* Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: Synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor β genotype of donor. *Blood* 2005; **106**: 3995–4001.
- 22 Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ *et al.* Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2201–2210.
- 23 Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson I V. An Investigation of Polymorphism in the Interleukin-10 Gene Promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; **24**: 1–8.
- 24 Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; **3**: 944–950.
- 25 Zhu P, Xie L, Yang Y, Wang J, Gong F, Fang M. IL-10 promoter polymorphism associated with decreased risk of aGvHD after stem cell transplantation: a meta-analysis. *Int J Hematol* 2013; **98**: 102–111.
- 26 Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LBLB, Dutra Marques SBSB, Vigorito AC, Penteadó Aranha FJJ *et al.* Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine* 2005; **32**: 171–177.

- 27 Silla L, Fischer GB, Paz A, Daudt LE, Mitto I, Katz B *et al.* Patient socioeconomic status as a prognostic factor for allo-SCT. *Bone Marrow Transplant* 2009; **43**: 571–577.
- 28 Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 281–286.
- 29 Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; **6**: e17063.
- 30 Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from hl-a-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974; **18**: 295–304.
- 31 Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol* 2008; **61**: 634–645.
- 32 Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Thakkinstian A, Attia J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J Epidemiol* 2005; **34**: 1319–1328.
- 33 Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Chen W, Nakao S, Hess AD. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): Interleukin 10 and interferon γ may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 2002; **100**: 2650–2658.
- 34 Haukim N, Bidwell JL, Smith AJP, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 2. *Genes Immun* 2002; **3**: 313–330.
- 35 Reviron D, Dussol B, Andre M, Brunet P, Mercier P, Berland Y. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc* 2001; **33**: 350–351.
- 36 Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E *et al.* Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation* 2002; **73**: 1886–1891.
- 37 Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998; **92**: 3943–3948.
- 38 Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 1999; **94**: 3941–3946.
- 39 Tambur ARR, Yaniv I, Stein J, Lapidot M, Shabtai E, Kfir B *et al.* Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2001; **33**: 502–503.
- 40 Visentainer JEL, Sell AM, Da Silva GC, Cavichioli ADG, Franceschi DSA, Lieber SR *et al.* TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet* 2008; **35**: 287–293.

- 41 Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M *et al.* Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol* 2002; **63**: 1055–1061.
- 42 Cox ED, Hoffman SC DB *et al.* Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 2001; **72**: 720–726.
- 43 De Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtoni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: Allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet* 2003; **30**: 5–10.
- 44 Hong CJ, Yu YWY, Chen TJ, Tsai SJ. Interleukin-6 genetic polymorphism and Chinese major depression. *Neuropsychobiology* 2005; **52**: 202–205.
- 45 Lee MK, Park AJ, Kim DH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 promoter gene polymorphisms are not associated with an increased risk of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; **77**: 1304–1305.
- 46 Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Dolzani P, Martelli M *et al.* Associations of the -174 G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. *Biogerontology* 2005; **6**: 415–423.
- 47 Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S, Sundblad A, Osterborg A, Björkholm M *et al.* Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2000; **109**: 39–45.
- 48 Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, De La Rosa G, Infante E, Balladares S *et al.* The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: Tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001; **62**: 979–991.
- 49 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**: 700–710.
- 50 Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004; **127**: 479–490.
- 51 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**: 1594–1600.
- 52 Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E *et al.* Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; **44**: 227–235.
- 53 Dickinson AM, Harrold JL, Cullup H. Haematopoietic stem cell transplantation: Can our genes predict clinical outcome? *Expert Rev Mol Med* 2007; **9**: 1–19.
- 54 Hajeer a H, Hutchinson I V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; **62**: 1191–1199.

- 55 Goyal RK, Lin Y, Schultz KR, Ferrell RE, Kim Y, Fairfull L *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms are associated with severity of acute graft-versus-host disease following matched unrelated donor bone marrow transplantation in children: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 927-936.
- 56 Rocha V, Franco RF, Bittencourt H, Jr WAS, Latouche A, Zago MA *et al.* Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002; **100**: 3908-3918.
- 57 Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SBD, Vigorito AC *et al.* IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 2007; **66**: 703-710.
- 58 Shah R, Selby ST, Yokley B, Slack RS, Hurley CK, Posch PE. TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: A pilot study. *Tissue Antigens* 2009; **74**: 50-56.
- 59 Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Karabon L, Bogunia-Kubik K, Lange A. Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; **34**: 339-344.
- 60 Sivula J, Turpeinen H, Volin L, Partanen J. Association of IL-10 and IL-10R β gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. *BMC Immunol* 2009; **10**: 24.
- 61 Bertinetto FE, Dall'Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L *et al.* Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2006; **33**: 375-384.
- 62 Resende RG, Correia-Silva J de F, Arao TC, Silva TA, Abreu MHNG, Bittencourt H *et al.* Investigation of functional IL-10 gene polymorphism and IL-10 levels in acute graft-versus-host disease. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 465-473.
- 63 Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *AmJRespirCrit Care Med* 1998; **158**: 1958-1962.
- 64 Cho IH, Song YK, Kim MG, Han N, Kim T, Oh JM. Association between interleukin-10 promoter gene polymorphisms and acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Hematology* 2015; **20**: 121-128.
- 65 Cooke KR, Ferrara JL. A protective gene for graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2183-2184.
- 66 Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Ertl B, Schulz U *et al.* Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2000; **25**: 237-241.
- 67 Xiao H, Cao W, Lai X, Luo Y, Shi J, Tan Y *et al.* Immunosuppressive Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome after Related and Unrelated Hematopoietic Cell Transplantation in a Chinese Population. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; **17**: 542-549.

- 68 Masetti R, Zama D, Urbini M, Astolfi A, Libri V, Vendemini F *et al.* Impact of inflammatory cytokine gene polymorphisms on developing acute graft-versus-host disease in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol Res* 2015; **2015**: 248264.
- 69 Nordlander A, Uzunel M, Mattsson J, Remberger M. The TNFD4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2002; **119**: 1133–1136.
- 70 Azarpira N, Ramzi M, Aghdaie MH, Darai M, Geramizadeh B. Interleukin-10 gene polymorphism in bone marrow transplant recipients. *Exp Clin Transplant* 2008; **6**: 74–79.
- 71 Leffell MS, Vogelsang GB, Lucas DP, Delaney NL, Zachary AA. Association between TGF-beta expression and severe GVHD in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 2001; **33**: 485–486.
- 72 Xiao HW, Lai XY, Luo Y, Shi JM, Tan YM, He JS *et al.* Relationship between TNFA, TNFB and TNFR2 gene polymorphisms and outcome after unrelated hematopoietic cell transplantation in a Chinese population. *Bone Marrow Transplant* 2011; **46**: 400–407.
- 73 Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5'-flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1101–1108.
- 74 Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ, Kimberly RP. Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Distal IL-10 Promoter Affect IL-10 Production and Enhance the Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2001; **166**: 3915–3922.
- 75 Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; **184**: 19–29.

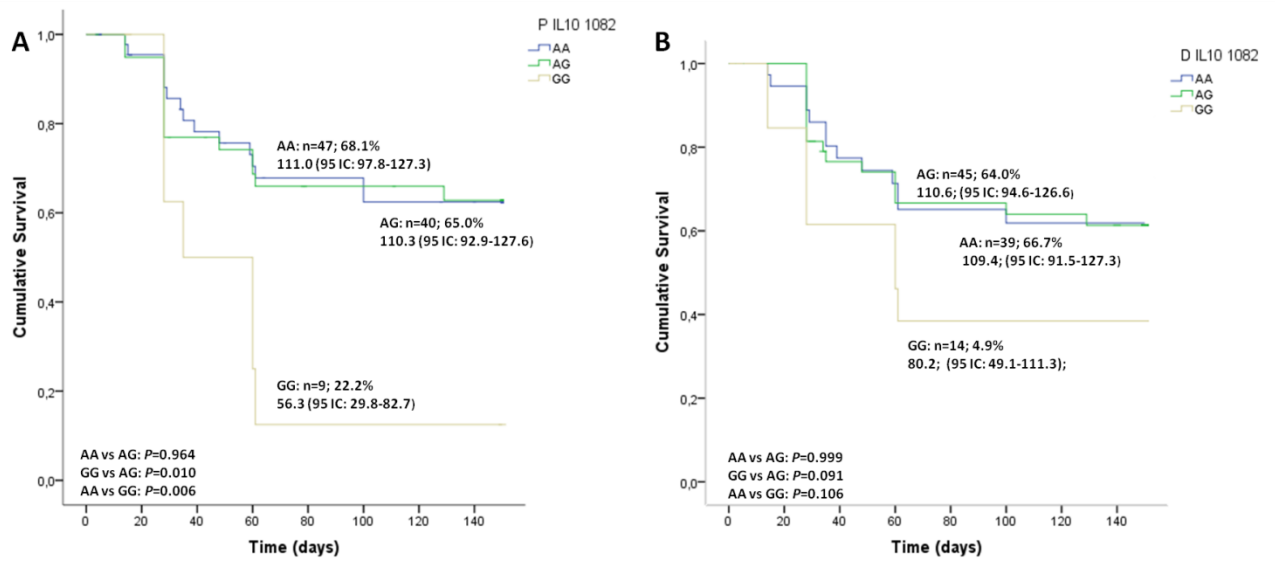


Figure 1. The influence of *IL-10* genotypes at position -1082 on GVHD-free survival in transplant (A) recipients and (B) donors.

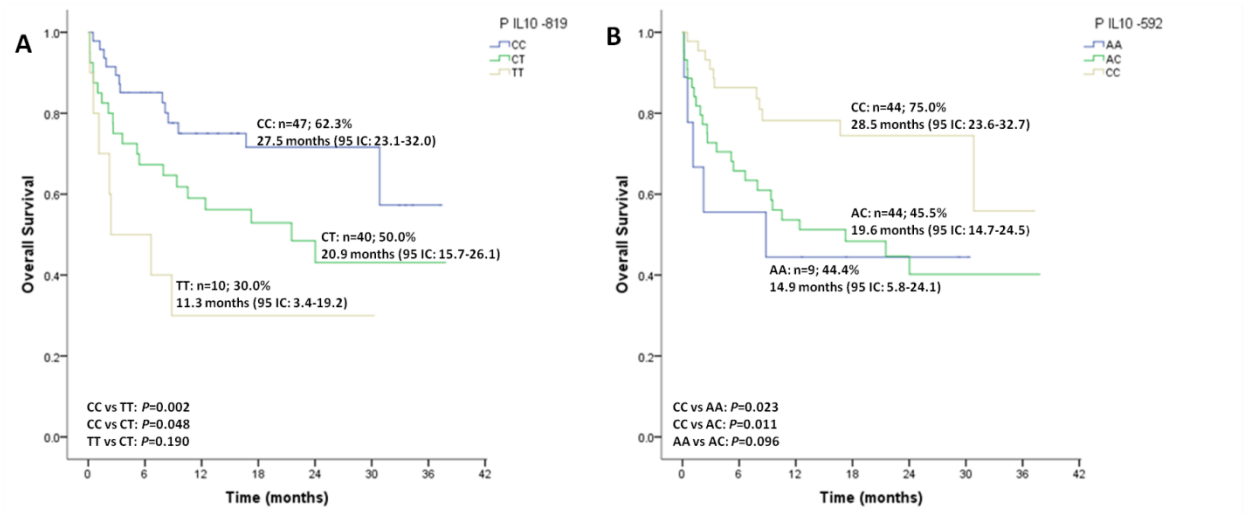


Figure 2. The influence of the transplant recipients' genotypes (A) *IL-10* -810 and (B) *IL-10* -592 on their overall survival.

Table 1. Gene polymorphisms analyzed in this study

Gene	Chromosome Location	Gene designation	Total SNPs analyzed	Marker	Polymorphic Site
<i>IL-6</i>	7p21	Interleukin-6	1	rs1800795	IL-6 -174 G/C
<i>INF-γ</i>	12q15	Interferon- γ	1	rs2430561	INF- γ +874 T/A
<i>IL-10</i>	1q31	Interleukin-10	3	rs1800896	IL-10 -1082 A/G
				rs1800871	IL-10 -819 C/T
				rs1800872	IL-10 -592 A/C
<i>TNF-α</i>	6p21	Tumor Necrosis Factor- α	2	rs361525	TNF- α -238 A/G
				rs1800629	TNF- α -308 A/G

Legend: SNPs: single-nucleotide polymorphisms; IL-6: Interleukin 6; INF- γ : Interferon gamma; IL-10: Interleukin 10; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha.

Table 2. Characteristics of transplant recipients and donors

Characteristics	n (%)
Recipients, n	99
Age (years)	15.0 (9.0-33.0)
Sex	
Female	41 (41.4)
Male	58 (58.6)
Disease	
ALL	32 (32.0)
AML	23 (23.0)
CML	3 (3.0)
Lymphomas	7 (7.0)
MM	1 (1.0)
Myelodysplasia	11 (11.0)
Aplasia	4 (4.0)
Hemoglobinopathies	2 (2.0)
Immunodeficiencies	6 (6.0)
Genetic diseases	6 (6.0)
Others	4 (4.0)
Conditioning regimen	
Myeloablative	47 (48.0)
Non-myeloablative	51 (52.0)
ATG	
Yes	39 (39.8)
No	59 (60.2)
a-GVHD prophylaxis	
Methotrexate + Cyclosporin A	33 (33.0)
Others	66 (67.0)
Origin of cells	
Bone marrow	76 (78.4)
Peripheral blood	18 (18.6)
Cord blood	3 (3.1)
HSCT type	
Related	30 (30.3)
Haploidentical	22 (22.2)
Unrelated	46 (46.5)
Syngeneic	1 (1.0)
Engraftment day (mean, range)	19 (9-34)

Donors, n	98
Age (years)	31 (22-39)
Sex	
Female	32 (33.3)
Male	64 (66.7)
Sex of donor/recipient	
Female/male	19 (19.6)
Other	78 (80.4)

Legend: ALL: acute lymphoid leukemia; AML: acute myeloid leukemia; CML: chronic myeloid leukemia; MM: multiple myeloma; ATG: anti-thymoglobulin; GVHD: graft-versus-host disease; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation. The age of recipients and donors are expressed in mean (percentiles).

Table 3. Comparison of genotypic and allelic frequencies between transplant recipients and donors

Gene	SNP position	Genotype	Frequency of recipients (%)	Frequency of donors (%)	<i>P</i>
			N=99	N=98	
<i>IL-6</i>	-174	GG	50 (51.5)	44 (44.9)	0.363
		GC	39 (40.2)	40 (40.8)	
		CC	8 (8.3)	14 (14.3)	
		G	139 (71.7)	128 (65.3)	0.215
		C	55 (28.3)	68 (34.7)	
<i>INF-γ</i>	+874	TT	16 (16.7)	18 (18.4)	0.953
		TA	45 (46.9)	45 (45.9)	
		AA	35 (36.4)	35 (35.7)	
		T	77 (40.1)	81 (41.3)	0.887
		A	115 (59.9)	115 (58.7)	
<i>TNF-α</i>	-238	AA	1 (1.0)	2 (2.0)	0.822
		AG	9 (9.3)	8 (8.2)	
		GG	87 (89.7)	88 (89.8)	
		A	11 (5.7)	12 (6.1)	1.000
		G	183 (94.3)	184 (93.9)	
<i>TNF-α</i>	-308	GG	78 (80.4)	75 (76.5)	0.341
		AG	19 (19.6)	21 (21.4)	
		AA	0 (0.0)	2 (2.1)	
		A	175 (90.2)	171 (87.2)	0.445
		G	19 (9.8)	25 (12.8)	
<i>IL-10</i>	-1082	AA	47(48.9)	39 (39.8)	0.349
		AG	40 (41.7)	45 (45.9)	
		GG	9 (9.4)	14 (14.3)	
		A	134 (69.1)	123 (62.8)	0.227
		G	60 (30.9)	73 (37.2)	
<i>IL-10</i>	-819	CC	47 (48.5)	48 (49.0)	0.550

		CT	40 (41.2)	44 (44.9)	
		TT	10 (10.3)	6 (6.1)	
		C	134 (69.1)	140 (71.4)	0.690
		T	60 (30.9)	56 (28.6)	
<i>IL-10</i>	-592	AA	9 (9.2)	7 (7.1)	0.756
		AC	44 (45.4)	42 (42.9)	
		CC	44 (45.4)	49 (50.0)	
		A	62 (32.0)	56 (28.6)	0.537
		C	132 (68.0)	140 (71.4)	

Legend: SNPs: single-nucleotide polymorphisms; IL-6: Interleukin 6; INF- γ : Interferon gamma; IL-10: Interleukin 10; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha.

Table 4. Association of genotypes/alleles of transplant recipients and donors with the presence and absence of a-GVHD

Gene	Genotype/allele	Recipients			Donors				
		Without a-GVHD	With a-GVHD	<i>P</i>	N	Without a-GVHD	With a-GVHD	<i>P</i>	
	N								
<i>IL6 -174 (G/C)</i>	97	GG	31 (62.0)	19 (38.0)	0.760	98	23 (52.3)	21 (47.7)	0.159
		GC	24 (61.5)	15 (38.5)			29 (72.5)	11 (27.5)	
		CC	6 (75.0)	2 (25.0)			9 (64.3)	5 (35.7)	
		G	86 (61.9)	53 (38.1)	0.764		75 (58.6)	53 (41.4)	0.196
		C	36 (65.5)	19 (34.5)			47 (69.1)	21 (30.9)	
<i>INFγ+874 (T/A)</i>	96	TT	10 (62.5)	6 (37.5)	0.408	91	13 (72.2)	5 (27.8)	0.627
		TA	31 (68.9)	14 (31.1)			27 (60.0)	18 (40.0)	
		AA	19 (54.3)	16 (45.7)			21 (60.0)	14 (40.0)	
		T	51 (66.2)	26 (38.8)	0.470		53 (65.4)	28 (34.6)	0.533
		A	69 (60.0)	46 (40.0)			69 (60.0)	46 (40.0)	
<i>TNFα-308 (A/G)</i>	97	AA	45 (57.7)	33 (42.3)	0.087	98	46 (61.3)	29 (38.7)	0.538
		AG	15 (78.9)	4 (21.1)			13 (61.9)	8 (38.1)	
		GG	0 (0.0)	0 (0.0)			2 (100.0)	0 (0.0)	
		A	105 (60.0)	70 (40.0)	0.172		105 (61.4)	66 (38.6)	0.678
		G	15 (78.9)	4 (21.1)			17 (68.0)	8 (32.0)	
<i>TNFα-238 (A/G)</i>	97	AA	0 (0.0)	1 (100.0)	0.102	98	1 (50.0)	1 (50.0)	0.701
		AG	8 (88.9)	1 (11.1)			4 (50.0)	4 (50.0)	
		GG	52 (59.8)	35 (40.2)			56 (63.6)	32 (36.4)	
		A	8 (72.7)	3 (27.3)	0.657		6 (50.0)	6 (50.0)	0.551
		G	112 (61.2)	71 (38.8)			116 (63.0)	68 (37.0)	

Legend: a-GVHD: acute graft-versus-host disease. The results are expressed as frequencies (percentages). *P* <0.05 was considered significant.

Table 5. Association of *IL-10* genotypes and alleles of allogeneic HSCT recipients and donors with the absence and presence of a-GVHD

Gene	N	Genotype Allele	Recipients			Donors				
			Without GVHD	With GVHD	<i>P</i>	N	Without GVHD	With GVHD	<i>P</i>	
			N (%)	N (%)		N (%)	N (%)			
<i>IL-10 -1082 (A/G)</i>	96	AA	32 (68.1)	15 (31.9)	0.031	98	26 (66.7)	13 (33.3)	0.265	
		AG	26 (65.0)	14 (35.0)			29 (64.4)	16 (35.6)		
		GG	2 (22.2)	7 (77.8)			6 (42.9)	8 (57.1)		
		A	90 (67.2)	44 (32.8)	0.062		81 (65.8)	42 (34.1)		0.230
		G	30 (51.7)	28 (48.3)	41 (56.2)		32 (43.8)			
<i>Recessive model</i>		AA+AG	58 (66.7)	29 (33.3)	0.024	55 (65.5)	29 (34.5)	0.187		
		GG	2 (22.2)	7 (77.8)	6 (42.9)	8 (57.1)				
<i>IL-10 -819 (C/T)</i>	97	CC	26 (55.3)	21 (44.7)	0.186	98	27 (56.3)	21 (43.8)	0.346	
		CT	29.0 (72.5)	11 (27.5)			29 (65.9)	15 (34.1)		
		TT	5 (50.0)	5 (50.0)	5 (83.3)		1 (16.7)			
		C	81 (60.4)	53 (39.6)	0.657		83 (59.3)	57 (40.7)		0.235
		T	39 (65.0)	21 (35.0)	39 (69.6)		17 (30.4)			
<i>Recessive model</i>		CC+CT	55 (63.2)	32 (36.8)	0.637	56 (60.9)	36 (39.1)	0.506		
		TT	5 (50.0)	5 (50.0)	5 (83.3)	1 (67.1)				
<i>IL-10 -592 (A/C)</i>	97	AA	6 (66.7)	3 (33.3)	0.648	98	5 (71.4)	2 (28.6)	0.343	
		AC	29 (65.9)	15 (34.1)			29 (69.0)	13 (31.0)		
		CC	25 (56.8)	19 (43.2)			27 (55.1)	22 (44.9)		
		A	41 (66.1)	21 (33.9)	0.496		39 (69.6)	17 (30.4)		0.235
		C	79 (59.8)	53 (40.2)	83 (59.3)		57 (40.7)			

<i>Recessive model</i>	AA+AC	35 (66.0)	18 (34.0)	0.471	34 (69.4)	15 (30.6)	0.211
	CC	25 (56.8)	19 (43.2)		27 (55.1)	22 (44.9)	

Haplotypes

0-2 mutated alleles	32 (71.1)	13 (28.9)	0.010	25(69.4)	11 (30.6)	0.433
3 mutated alleles	26 (63.4)	15 (36.6)		13 (61.9)	8 (38.1)	
4-6 mutated alleles	2 (20.0)	8 (80.0)		22 (55.0)	18 (45.0)	

The results are expressed as percent number (%) or proportion. *P values calculated using Chi-square t

8 ARTIGO 3

Plasma IL-6 levels in haploidentical HSCT recipients treated with post-transplant cyclophosphamide

High plasma IL-6 levels following haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in recipients treated with post-transplant cyclophosphamide

Mariela Granero Farias^{1,2}, Bruna de Mello Vicente³, Muriel Habigzang³, Iuri Vicente Camargo Morkis^{1,2}, Priscila de Oliveira da Silva², Camila Andrade dos Santos², Alessandra Paz², Liane Esteves Daudt^{1,2,3}.

¹ Graduate Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

² Hospital de Clínicas of Porto Alegre/HCPA

³ Federal University of Rio Grande do Sul/UFRGS

Corresponding author:

Mariela Granero Farias, M.Sc.
Specialized Diagnostic Unit, Flow Cytometry
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcellos, 2350
Porto Alegre, Brazil
90035-903
Phone +55 51 33597779
E-mail: mgfarias@hcpa.edu.br.

ABSTRACT

Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT) can be used as an alternative procedure in the absence of HLA-compatible donors. The use of high doses of cyclophosphamide after infusion improves the prognosis and eliminates the need for T cell depletion *in vivo*. One of the complications of haplo-HSCT is the cytokine release syndrome (CRS), a systemic inflammatory response that leads to the release of inflammatory proteins, including IL-6. This syndrome has several clinical features, with mild to severe symptoms. This study aimed to compare plasma IL-6 levels in patients submitted to different HSCT types and to associate them with the presence of acute GVHD (a-GVHD) and CRS. A total of 85 patients (22 haploidentical and 63 non-haploidentical) were evaluated at different times. The IL-6 levels in haplo-HSCT and non-haplo-HSCT recipients were measured before transplantation and on days D7, D14, D28, D60, and D100. IL-6 levels were higher in haplo-HSCT recipients than in non-haplo-HSCT recipients ($P=0.001$). The IL-6 levels in haplo-HSCT patients remained elevated from D14 until D100. The patients undergoing haplo-HSCT who developed the CRS had higher IL-6 levels in the early follow-up period. IL-6 quantification may guide the use of anti-IL-6R blockers, which is beneficial for patients undergoing HSCT by preventing severe complications, such as Central Nervous System involvement.

Keywords: Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation; IL-6; Acute GVHD; Cytokine Release Syndrome; Neurotoxicity.

1 INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) has been used to treat various hematological and immunological disorders. Despite the great potential of this type of transplant, the procedure itself has limitations such as toxicity due to the conditioning regime and the possibility of developing graft-versus-host disease (GVHD) and infections. Another major limitation of allo-HSCT is the lack of HLA-compatible donors.¹

Historically, the best transplant outcomes have been obtained with the use of HLA-compatible donors. In the absence of these, the use of unrelated HLA donors, is recommended, although they are limited in availability, especially for recipients from ethnic minorities and mixed races.^{2,3} Therefore, due to the ease of finding haploidentical donors, this type of transplant has become an alternative for such patients.⁴ Allo-HSCT is characterized by a shared familial haplotype, with at least 50% compatibility between donor and recipient.¹

Although allo-HSCT is an alternative in many situations, its use is related with a high incidence of graft rejection, severe GVHD and higher rate of relapse.⁴⁻⁶ The use of T-cell depletion methods reduce the incidence of GVHD, but may inhibit graft-versus-leukemia (GVL), increases the rate of relapse, and slow immune reconstitution. To reduce these complications, methods for selective inhibition of allo-reactive T cells have been developed, which are reported to prevent infections and malignancies.^{7,8} In the last few years, there has been an alternative approach to allo-HSCT using T-cell grafts in combination with high doses of post-transplant cyclophosphamide. The use of high-dose post-transplant cyclophosphamide limits the use of immunosuppressants and favors immune reconstitution, thereby preventing graft rejection and GVHD.⁹ However,

despite these benefits, this protocol was associated with approximately 50% relapse one year after HSCT,⁹ which may be a result of the reduced intensity of the conditioning regimen or depletion of allo-reactive T cells directly decreasing the GVL effect. The use of high-dose post-transplant cyclophosphamide as a prophylactic regimen for GVHD has considerably broadened the frequency of allo-HSCT procedures.^{1,9-13}

GVHD is caused by an immune reaction of donor T cells against host HLA antigens.¹⁴ Currently, GVHD prophylaxis regimens inhibit allo-reactive T cell activation and proliferation, IL-2 production, and interfere in the apoptosis of the T cell,^{15,16} resulting in global immunosuppression and delayed induction of transplant tolerance.¹⁷

Another common complication of haplo-HSCT is the cytokine release syndrome (CRS). This syndrome is defined as a systemic inflammatory response associated with increased levels of several proteins and growth factors. The CRS was first described after the use of cellular therapies, such as those with chimeric T-cell antigen receptor (CAR-T).¹⁸⁻²³ The clinical features of the CRS include high levels of inflammatory markers and cytokines, C-reactive protein (CRP), ferritin, INF-gamma, and IL-6. The first clinical sign is fever, which may progress to ventilatory shock and capillary leak syndrome and then to respiratory failure and other organ dysfunctions.^{18,24}

In addition to traditional laboratory tests, e.g. quantification of inflammatory markers, CRP and ferritin,^{19,21,25} several studies have evaluated the activation profile of cytokines that are involved in the CRS pathogenesis,^{18-21,25,26} mainly effector cytokines (e.g. INF-gamma and soluble IL-2 alpha receptor – sIL-2 α) as well as cytokines associated with macrophage activation (e.g. IL-6 and IL-10).²⁷

IL-6 is a major CNS element that is involved in neuroinflammation, neurotropic processes and other neurological conditions.²⁸ Consequently, the increase in IL-6

amounts may lead to neurotoxicity, which is a common manifestation in the CRS. Humanized anti-IL-6R monoclonal antibody therapy, like tocilizumab, can be used to block IL-6 signaling and thereby prevent its neurotoxic effects.^{19,29}

Due to the central role of cytokines in the pathophysiology of the CRS, laboratory protein quantification, especially of IL-6, can be extremely useful in understanding the disease and indicating the most appropriate therapy for IL-6 modulation and prevention of severe symptoms.^{18,19,30} This study aimed to determine plasma IL-6 levels in patients undergoing haplo-HSCT who were administered high-dose post-transplant cyclophosphamide as well as to associate the IL-6 measurements with the presence of acute GVHD and CRS.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study population

Haploidentical and non-haploidentical (related, unrelated, syngeneic) allogeneic HSCT patients were evaluated in a university hospital of Porto Alegre. The samples were obtained from April 2015 to April 2018. To determine plasma IL-6 levels, peripheral blood samples were drawn pre- and post-transplant on days 7, 14, 28, 60 and 100. Patient characteristics and transplant-related procedures are presented in Table 1. For related transplants, low-resolution HLA typing was performed serologically for HLA-A, -B and -DRB1 using the Luminex Labscan 100 analyzer (Luminex Corp., Austin, TX, USA). For unrelated transplants, high-resolution HLA typing using molecular typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 was performed in the ABI 3500 XL Dynal sequencer (Applied Biosystems, New York, USA). The conditioning

regimen in haplo-HSCT procedures consisted of high doses of post-transplant cyclophosphamide. The presence or absence of acute GVHD was established according to Glucksberg et al.'s criteria and the CRS was identified according to graduation system of Lee et al.¹⁸ Our study was previously approved by the research ethics committee of the Hospital of Clínicas of Porto Alegre, under protocol number 14-0607. All recipients or their legal guardians who participated in the study signed an informed consent form.

2.2 IL-6 quantification

The plasma IL-6 concentration was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit with IL-6 Human soluble Protein Flex Set (BD Biosciences, San Diego, CA). The analytical procedure was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were incubated with cytokine capture beads and their respective conjugate detection antibody at room temperature and protected from light. The samples were washed, and the data acquisition was performed with FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA). A standard curve was plotted using the BD CBA Analytical Software FCAP Array™ 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA). The R^2 curve was greater than 0.99 and the results were obtained from the logistic equation.

2.3 Statistical analysis

The data were analyzed in SPSS version 18.0. Median and P25 and P75 percentiles were used for descriptive analysis. Generalized linear model (GLM) and

Bonferroni test were used to determine the association of IL-6 measurements with the other variables, with a 5% significance level.

3 RESULTS

A total of 85 patients of both sexes were evaluated, with 22 (20.8%) submitted to haplo-HSCT and 63 (59.4%) HLA-compatible HSCT recipients (23 related, 39 unrelated and 1 syngeneic). As for the haploidentical patients, 8 (36.4%) were females and 14 (63.6%) were males, with a median age of 13 years (7.5-26.7 years). Sampled patients had the following underlying diseases: acute myeloid leukemia (n=8), acute lymphoid leukemia (n=4), lymphoma (n=3), chronic myelogenous leukemia (n=1), myelodysplastic syndrome (n=1), aplastic anemia (n=1), immunological diseases (n=3), and osteopetrosis (n=1). Seven patients presented acute GVHD (31.8%) and 13 patients (59.1%) died. The CRS was present in 6 (27.3%) patients and 4 of them (66.7%) died, although the syndrome was not associated with the cause of death ($P = 0.659$).

The quantification of IL-6 in patients submitted to different HSCT types showed higher IL-6 levels among haplo-HSCT recipients than among other types of allogeneic HSCT recipients ($P = 0.001$). As shown in Figure 1, plasma IL-6 levels in haplo-HSCT recipients increased from D14 and remained elevated until D100. IL-6 measurements and their corresponding significance levels are shown in Table 2.

There was no significant association between IL-6 levels and the presence of acute GVHD ($P=0.225$) or CRS ($P=0.058$) in haplo-HSCT patients. Nevertheless, there was a tendency for IL-6 increase in the early post-transplant period in patients who presented the CRS, with stabilization of IL-6 levels in later timepoints up to D100 (Figure 3). The values of IL-6 in this groups patients are represented in the table 3.

4 DISCUSSION

The haploidentical HSCT has been an effective alternative in the absence of HLA-compatible related or unrelated donors^{10,31} for patients with severe illnesses or with relapse. Nevertheless, while post-transplant cyclophosphamide as a prophylaxis for acute GVHD has made the haplo-HSCT procedure possible on a larger scale.³² High doses of this drug are associated with elevated plasma IL-6 levels, which can result in the CRS and toxicity after treatment.^{18–20,33}

High-dose post-transplant cyclophosphamide has enabled a successful haplo-HSCT therapy by reducing early transplant-related complications (e.g. GVHD, rejection) and allowing the preservation of immunity and protection from infection. Nevertheless, despite these beneficial effects, it may decrease the GVL effect and thereby lead to high rates of relapse of the underlying disease. Another complication is that it increases cytokine production, such as IL-6, which can potentially trigger the onset of CRS and result in neurological conditions.

CRS is an inflammatory phenomenon involving many signaling molecules secreted by activated T cells³⁴, including IL-6, which appears to be the central mediator of the disease.^{19,21,22} While this syndrome manifests in the immediate post-transplant period, it may have long-term clinical effects out of the 0-14-day time window.³⁵

IL-6 is a pleiotropic cytokine that plays a key role in the pathophysiology of acute GVHD and in several inflammatory diseases, in addition to causing toxic effects on the CNS.²⁸ In our study, we quantitated plasma IL-6 levels in haplo-HSCT recipients throughout a 100-day follow-up period, before and after transplantation, and compared the findings obtained with those of non-haploidentical and autologous HSCT recipients. The kinetics of IL-6 within 100 post-transplant days was also evaluated.

Our results showed that patients submitted to allogeneic (haploidentical and non-haploidentical) and autologous HSCT, under specific conditioning regimens, presented differences in IL-6 production throughout the post-transplant follow-up. Consistent with previous studies, plasma IL-6 levels were higher in haplo-HSCT recipients as compared to other types of HSCT.³⁵ In the haplo-HSCT group, cytokine production was higher after the initial two post-transplant weeks and remained elevated until D100. In contrast, non-haploidentical and autologous HSCT recipients had a significant increase in IL-6 levels in the early post-transplant period, but they returned to baseline values and stabilized.

In our study, we found no significant association between haplo-HSCT and the presence of GVHD. In addition, haplo-HSCT recipients did not show any differences in the production of IL-6 in the presence or absence of GVHD throughout the follow-up period.

In the group of haplo-HSCT recipients, we did not find an association between IL-6 and the CRS, but we did observe that patients with the CRS showed a tendency to present higher IL-6 levels in the early transplant periods (pre-transplant, D7 and D14) when compared to those who did not develop the CRS. These findings suggest that recipients with high IL-6 levels in the early stages of transplantation were more likely to develop the syndrome.

Laboratory quantification of plasma IL-6 may be an effective measure for monitoring patients throughout the pre- and post-transplant period. This enables the modulation of IL-6 levels to prevent the onset of CRS and its more severe effects (e.g., neurological complications) while favoring the use of targeted therapies. Recent studies have shown a rapid resolution of the syndrome symptoms with the use of IL-6 blockers.

The authors further reported that this may be an effective treatment for patients who develop the CRS following haplo-HSCT.

Further research, particularly multicenter studies, should investigate the direct effects of the IL-6 and inflammatory response post-transplant increasing in haplo-HSCT recipients as well as the interference of IL-6 levels in the post-transplant clinical outcome. Taken altogether, these findings may improve the patients' response to this type of treatment and ultimately improve their quality of life.

FINANCIAL SUPPORT

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

REFERENCES

1. Luznik, L., O'Donnell, P. V. & Fuchs, E. J. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin. Oncol.* **39**, 683–693 (2012).
2. Raiola, A. M. *et al.* Unmanipulated Haploidentical Bone Marrow Transplantation and Posttransplantation Cyclophosphamide for Hematologic Malignancies after Myeloablative Conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **19**, 117–122 (2013).
3. Gragert, L. *et al.* HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N. Engl. J. Med.* **371**, 339–348 (2014).
4. Kanda, Y. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* **102**, 1541–1547 (2003).
5. Kernan, N. A., Flomenberg, N., Dupont, B. & O'Reilly, R. J. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted hla-nonidentical marrow transplants for leukemia: Identification of host-derived antidonor allo cytotoxic T lymphocytes. *Transplantation* **43**, 842–847 (1987).
6. Kernan NA, Collins NH, J. L. *et al.* Clonable T Lymphocytes in T Cell-Depleted Bone Marrow Transplants Correlate With Deveopment of Graft-v-Host Disease. *Blood* **68**, 770–773 (2016).
7. Dey, B. R. & Spitzer, T. R. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **135**, 423–437 (2006).
8. Guinan, E., Luzmik, L., Handgretinger, R. & Woolfrey, A. Preservation of immune repertoire by selective depletion of haploidentical grafts. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, S68–S74 (2010).
9. Luznik, L. *et al.* HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 641–650 (2008).
10. Bashey, A. *et al.* T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1310–1316 (2013).
11. Kanakry, J. A. *et al.* Outcomes of related donor HLA-identical or HLA-haploidentical allogeneic blood or marrow transplantation for peripheral T cell lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **19**, 602–606 (2013).
12. Raj, K. *et al.* Peripheral blood hematopoietic stem cells for transplantation of hematological diseases from related, haploidentical donors after reduced-intensity conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 890–895 (2014).
13. Bhamidipati, P. K. *et al.* Haploidentical transplantation using G-CSF-mobilized T-cell replete PBSCs and post-transplantation CY after non-myeloablative

- conditioning is safe and is associated with favorable outcomes. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 1124–1126 (2014).
14. Ferrara, J., Levine, J., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550–1561 (2009).
 15. Strauss, G., Osen, W. & Debatin, K.-M. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 255–266 (2002).
 16. Zeiser, R. & Negrin, R. S. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle* **7**, 458–462 (2008).
 17. Li, Y. *et al.* Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive t cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* **5**, 1298–1302 (1999).
 18. Lee, D. W. *et al.* How I Treat: Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188–196 (2014).
 19. Maude, S. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1507–1517 (2014).
 20. Teachey, D. T. *et al.* Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia HHS Public Access. *Cancer Discov.* **6**, 664–679 (2016).
 21. Davila, M. L. *et al.* Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Marco. *Sci Transl Med* **6**, 224–225 (2014).
 22. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
 23. Teachey, D. T. *et al.* Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood* **121**, 5154–5157 (2013).
 24. Frey, N. V & Porter, D. L. Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute lymphoblastic leukemia. *ASH Educ. Progr. B.* **2016**, 567–572 (2016).
 25. Topp, M. S. *et al.* Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: A multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **16**, 57–66 (2015).
 26. Turtle, C. J. *et al.* CD19 CAR – T cells of defined CD4 + : CD8 + composition in adult B cell ALL patients. **126**, 2123–2138 (2016).
 27. Barrett, D. M., Teachey, D. T. & Grupp, S. A. Engaging Therapies. *Curr Opin Pediatr* **26**, 43–49 (2014).
 28. Spooren, A. *et al.* Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* **67**, 157–183 (2011).
 29. Kennedy, G. A. *et al.* Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: A phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 1451–1459 (2014).

30. Xu, X. J. & Tang, Y. M. Cytokine release syndrome in cancer immunotherapy with chimeric antigen receptor engineered T cells. *Cancer Lett.* **343**, 172–178 (2014).
31. Bashey, A. & Solomon, S. R. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: An emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 999–1008 (2014).
32. Luznik, L., Jones, R. & Fuchs, E. High dose cyclophosphamide for GVHD prevention. *Curr Opin Hematol* **17**, 493–499 (2010).
33. Colvin, G. A. *et al.* Nonengraftment Haploidentical Cellular Immunotherapy for Refractory Malignancies: Tumor Responses without Chimerism. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 421–431 (2009).
34. Tisoncik, J. R. *et al.* Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 16–32 (2012).
35. Abboud R, Keller J, S. M. *et al.* Severe Cytokine Release Syndrome Following T-cell Replete Peripheral Blood Haploidentical Donor Transplant is Associated with Poor Survival and Anti-IL-6 Therapy is Safe and Well Tolerated. *Biol Blood Marrow Transplant.* **22**, 1851–1860 (2016).

Table 1. Characteristics of patients submitted to different HSCT types and of their respective donors

Characteristics	HSCT type	
	Haplo N (%)	Non-haplo N (%)
Recipients	22.0 (20.8)	63.0 (59.4)
Age (years)	13.0 (7.5-26.7)	15.0 (8.0-34.0)
Sex		
Female	8.0 (36.4)	29.0 (46.0)
Male	14.0 (63.6)	34.0 (54.0)
Disease		
Benign	10.0 (45.5)	24.0 (38.1)
Malignant	12.0 (54.5)	39.0 (61.9)
Engraftment day	18.0 (13.0-34.0)	18.5 (9.0-31.0)
Conditioning regimen		
Myeloablative	7.0 (31.8)	35 (57.4)
Non-myeloablative	15.0 (68.2)	26 (42.6)
HSC origin		
Bone marrow	19.0 (90.5)	44.0 (81.5)
Peripheral blood	1.0 (4.8)	10.0 (18.5)
Cord blood	1.0 (4.8)	0.0 (0.0)
Acute GVHD		
Yes	7.0 (31.8)	25.0 (39.7)
No	15.0 (68.2)	38.0 (60.3)
GVHD grade		
0-I	21.0 (95.5)	48.0 (76.2)
II-IV	1.0 (4.5)	15.0 (23.8)
Cytokine Release Syndrome		
Present	6.0 (27.3)	NA
Ausent	16.0 (72.7)	
Death		
Yes	13.0 (59.1)	19.0 (30.2)
No	9.0 (40.9)	44.0 (69.8)
Donors		
Age (years)	31.0 (24.5-38.0)	31.5 (21.0-41.5)
Sex		
Female	7.0 (31.8)	19.0 (15.6)
Male	15.0 (68.2)	35.0 (54.7)
FD MR		
Yes	5.0 (22.2)	10.0 (15.6)
No	17.0 (77.3)	44.0 (68.8)

Legend: GVHD, Graft versus Host Disease; HSC, Hematopoietic Stem Cell; FD MR, Female Donor and Male Recipient; NA, not applicable. The age of recipients and donors are expressed in median (range).

Table 2: Comparison of pre- and post-transplant IL-6 plasma levels between recipients who underwent haploidentical and non-haploidentical HSCT

Period	IL-6 quantification (pg/mL)		
	Haploidentical	Non-haploidentical	<i>P</i>
Prior	2.65 (0.88-13.69)	1.66 (0.11-6.42)	0.164
D7	7.85 (1.67-30.27)	22.42 (8.60-43.25)	0.057
D14	16.43 (7.68-77.35)	6.80 (2.20-26.65)	0.002
D28	7.82 (2.88-27.47)	2.60 (0.58-9.82)	<0.001
D60	10.14 (2.76-29.60)	1.28 (0.32-7.21)	<0.001
D100	4.94 (1.47-10.15)	1.81 (0.16-6.98)	0.013

Legend: a-GVHD, Acute Graft Versus Host Disease; NP, Not Performed. The results are expressed as median and percentiles (P25-P75), with statistical significance at $P < 0.05$.

Table 3. Values of IL-6 levels in patients with and without CRS in haploidentical HSCT

Period	IL-6 quantification (pg/mL)		
	No-CRS	CRS	P
Prior	2.59 (0.12-13.49)	9.44(2.65-15.35)	0.014
D7	7.10 (0.75-24.40)	15.88 (3.70-41.56)	0.222
D14	14.96 (5.71-33.71)	71.96 (13.57-156.23)	0.106
D28	11.81 (3.53-27.47)	11.12 (2.94-144.3)	0.405
D60	18.43 (3.47-34.04)	10.57 (4.55-38.47)	0.963
D100	4.31 (1.30-8.54)	4.94 (2.15-11.96)	0.922

Legend: CRS, Cytokine release syndrome, HSCT, Allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Statistical significance at $P < 0.05$.

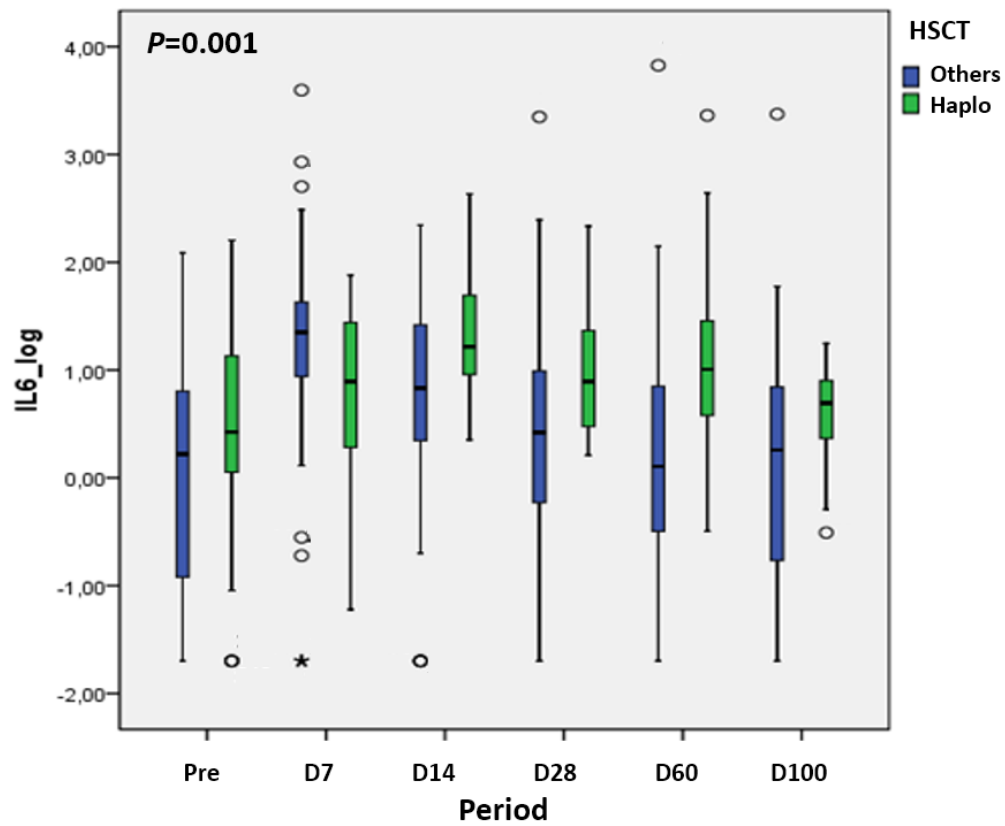


Figure 1. Plasma IL-6 measurements in patients submitted to haploidentical and non-haploidentical (related and unrelated) HSCT before transplantation and on post-transplant days D7, D14, D28, D60, and D100.

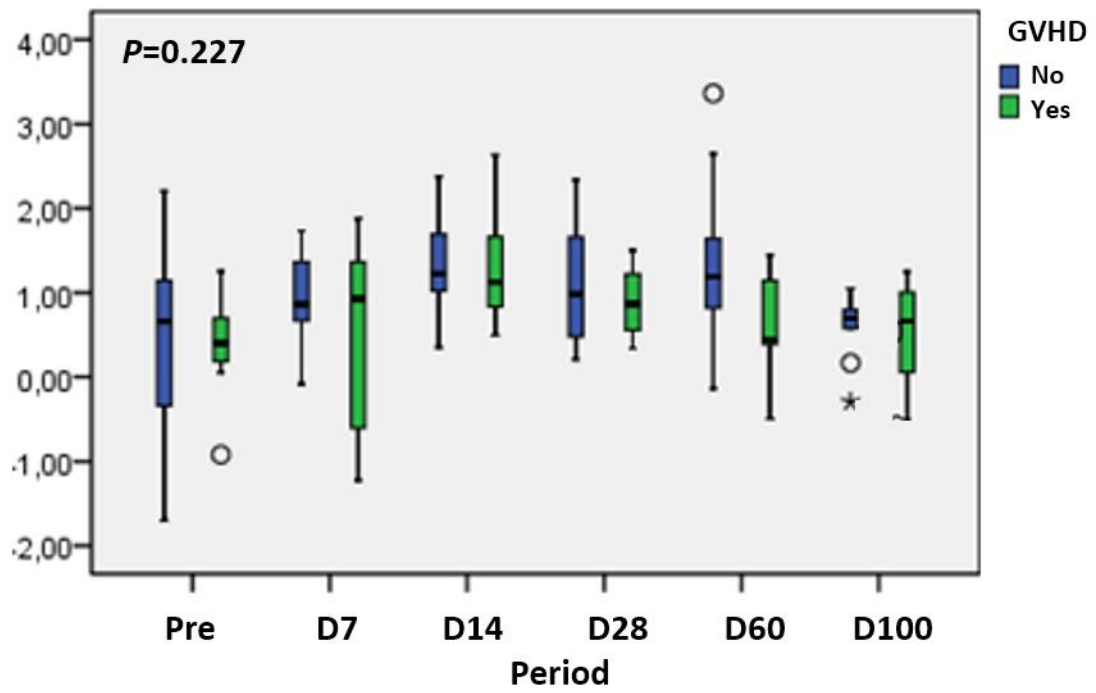


Figure 2. Association between plasma IL-6 levels and the presence of acute GVHD in haplo-HSCT recipients before transplantation and on post-transplant days D7, D14, D28, D60, and D100.

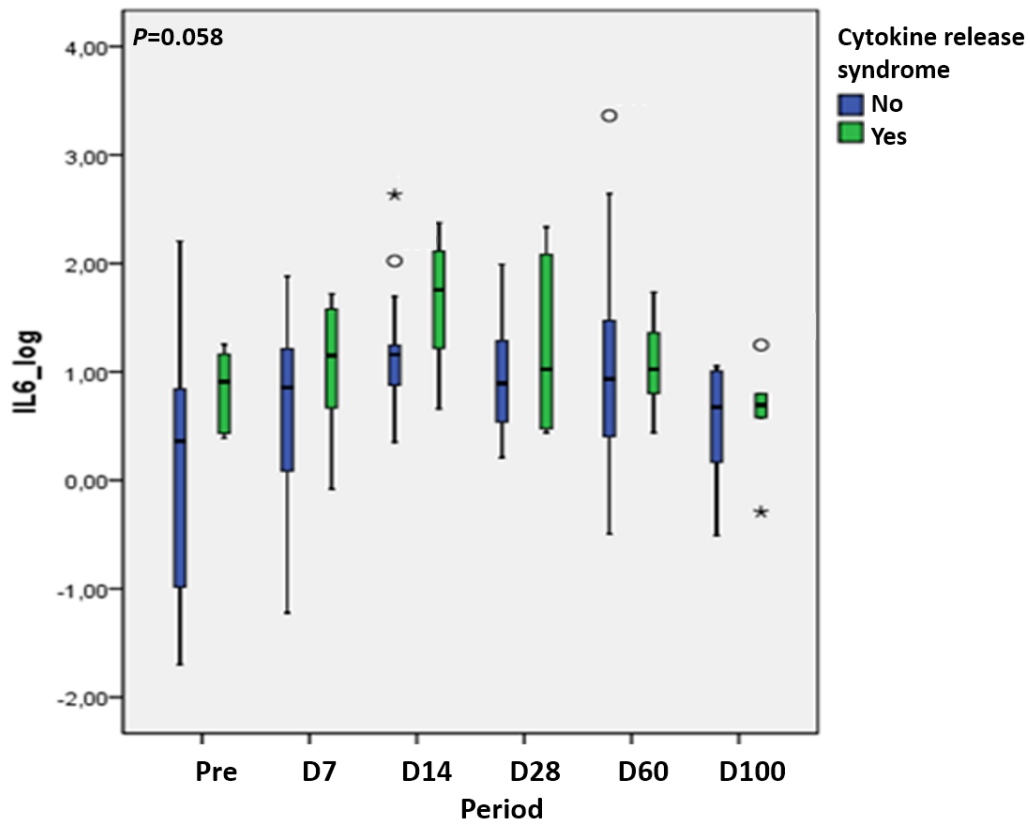


Figure 3. Association between plasma IL-6 levels and the Cytokine Release Syndrome in haplo-HSCT recipients before transplantation and on post-transplant days D7, D14, D28, D60, and D100.

9 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, ocorreram muitos avanços nas técnicas e nos cuidados pós-transplante, mas a DECH continua sendo o maior obstáculo no TCTH-alo. Trata-se de uma doença complexa, multissistêmica, onde diversos fatores têm um papel na orquestra da inflamação, reparo e regeneração tecidual. O regime de condicionamento provoca dano tecidual que responde com aumento de citocinas inflamatórias, entre elas a IL-6. As citocinas estimulam as CAA, que ativam os linfócitos T do doador que proliferam e se diferenciam em T citotóxicos. Estes juntamente com outras citocinas inflamatórias e células efectoras causam apoptose nos órgãos alvos. A IL-6 tem um papel importante no controle da resposta imune inata e adaptativa.

O impacto do SNP do gene da IL-6 no risco de DECH indica que essa citocina tem uma grande influência durante o desenvolvimento da doença. Muitos dos efeitos pró-inflamatórios da IL-6 parece ser causado pela trans-sinalização. Tratamentos com inibidores seletivos inibem a inflamação e preservam o efeito regenerativo da IL-6 em modelos animais em uma variedade de doenças. As células T Th CD4+ *naïves* se diferenciam em Th1, Th2, Th17 e T Regs. Sabe-se que as células Th1 e Th17 favorecem a DECH pela liberação de citocinas Th1 (INF-gama, IL-2 e TNF-alfa) e Th17 (IL-17). A IL-6 tem um importante papel na DECH, o aumento da IL-6 se liga ao TGF- β e estimula as células Th17, inibindo as células T Regs. Já o bloqueio da IL-6 favorece as células T Regs, que é imunossupressora, apresentando um efeito protetor na DECHa.

No nosso estudo, no acompanhamento dos 100 dias após o TCTH, ocorreu uma elevação dos níveis da IL-6 no D7 e D14 e após esse período, os níveis voltaram ao basal. As crianças sem DECH apresentaram níveis maiores de IL-6 que as crianças com DECH. Para verificar este efeito é importante o estudo das vias de sinalização, possivelmente a via

clássica, por ser anti-inflamatória e regenerativa, mantém-se mais ativa que a via de trans-sinalização, que apresenta atividade pró-inflamatória. Entretanto, existem poucos estudos na população pediátrica, sendo necessários futuros estudos para um melhor entendimento de fatores clínicos, biológicos, genéticos, farmacogenômicos que podem estar influenciando nestes resultados.

Encontramos um aumento da produção de IL-6 plasmática nos pacientes submetidos ao TCTH-haplo. A utilização da ciclofosfamida pós-transplante permitiu a expansão deste tipo de procedimento, diminuindo a DECH e melhorando a resposta imune, porém, pode ocorrer complicações como a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Altos níveis dessa citocina podem acarretar em complicações, como problemas neurológicos, nesse grupo de pacientes.

Os genes produtores de citocinas podem apresentar polimorfismos na região regulatória, influenciando a produção dos níveis de citocinas, e no surgimento de uma série de doenças, incluindo a DECHa. Encontramos associação da *IL-6* posição -174 GG na produção da citocina, conforme já relatado por outros autores. O polimorfismo da IL-10 apresentou associação do genótipo -1082 AA com a prevenção da DECHa e o GG com o risco da doença. Os polimorfismos CC da IL-10 -819 e -592 com a SG. É importante que cada Instituição realize o seu estudo genético, para o conhecimento da frequência dos genótipos da sua população. Dentro das populações normais, os produtores altos ou baixos de citocinas existem naturalmente por causa dos polimorfismos herdados. Isso permitirá o conhecimento de genótipos altos e baixos produtores de interleucinas, e sua influência no desenvolvimento de DECH ou no prognóstico do TCTH.

Atualmente, o método usado para o diagnóstico da DECHa é baseado principalmente em manifestações clínicas e biópsias invasivas. A falta de biomarcadores específicos torna o

diagnóstico diferencial da DECH difícil e pode levar ao subdiagnóstico. Um diagnóstico rápido e acurado, utilizando métodos que sejam acessíveis e práticos, é essencial para um tratamento efetivo. Citocinas no plasma ou soro são fortes candidatos, devido a sua associação com a patofisiologia da DECH, mas a medida de apenas uma citocina é um teste insuficiente. Assim, a utilização da IL-6 e dos polimorfismos dos genes produtores de citocinas, podem ser úteis como testes laboratoriais no acompanhamento dos pacientes submetidos ao transplante alogênico, que podem ser utilizados como preditores de DECHa gerando grandes benefícios para muitos pacientes. A utilização de biomarcadores na prática clínica do TCTH permitirá um melhor entendimento na biologia do transplante, a elaboração de regimes profiláticos adequados de acordo como perfil do paciente, e uso de terapias alvos, como os bloqueadores de citocinas, podendo ser útil na prevenção de futuras complicações e escolha do melhor doador.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos estudos no campo do TCTH-alo durante todos esses anos, desde a sua descoberta, vêm contribuindo para o melhor entendimento da biologia e para o controle terapêutico de pacientes submetidos ao procedimento. Novas fontes de CTH, o desenvolvimento de regimes de tratamento de intensidade reduzida, a maximização do efeito do enxerto-contra-leucemia leva ao menor risco de o paciente desenvolver a DECH aguda.

A evolução no campo da imunologia trouxe uma grande contribuição no entendimento da patogênese da DECH e seus mecanismos. Já está bem estabelecido o papel de fatores como a compatibilidade do sistema HLA, a participação crucial das células linfoides T maduras, a liberação de citocinas e presença de polimorfismos em seus genes produtores, no desenvolvimento da DECH aguda.

Testes laboratoriais vêm contribuir como novos biomarcadores para prever o risco de DECH aguda e complicações no TCTH-alo. Não existe um único marcador que tenha este papel, mas a criação de um painel, constituído por um conjunto de fatores clínicos e laboratoriais, pode servir como preditor de DECH aguda, antes do surgimento dos primeiros sintomas. Isto permite a escolha de tratamentos profiláticos diferenciados, assim como a elegibilidade de um doador mais adequado.