

Resumo de Tese/Thesis

Testes prognósticos de rejeição e doença do enxerto contra o hospedeiro em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas com doadores HLA idênticos
Prognostic tests of rejection and graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with HLA-identical donors

Jeane E. L. Visentainer

Orientador
Cármino A. Souza

Resumo

O transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas é o tratamento de escolha para muitas doenças hematológicas e imunodeficiências primárias. A seleção de doadores é baseada na definição de moléculas HLA-A e -B por sorologia, de alelos HLA-DRB1 e -DQB1 por técnicas de biologia molecular e na cultura mista de linfócitos clássica (CML). Apesar disso, a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) é ainda uma grave complicação, que ocorre em aproximadamente 35% dos receptores de medula HLA-idênticos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o poder prognóstico da ocorrência de rejeição e GVHD dos seguintes testes laboratoriais: 1 – cultura mista de linfócitos clássica (CML) e potencializada com citocinas exógenas (CMLp); 2 – tipagem dos genes reguladores de citocinas, pela técnica de PCR-SSP; e 3 – seguimento do nível sérico de citocinas dos pacientes transplantados, empregando-se métodos imunoenzimáticos quantitativos. No estudo, foram avaliados 118 transplantes, com doadores HLA-idênticos, realizados no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), durante o período de agosto de 1994 a fevereiro de 2002. Na CMLp, a resposta dos

linfócitos do doador contra as células do receptor (DxR) foi aumentada 1,9 e 4,1 vezes, com a adição de IL-4 (100 ng/mL) e IL-2 (10 ng/mL), respectivamente. Todavia, a resposta do doador contra suas próprias células (DxD) também sofreu um incremento de 2,0 e 6,4 vezes, respectivamente. Como o tratamento avaliado também induziu aumento das respostas autólogas, o emprego da CMLp não trouxe vantagens adicionais ao método tradicional (CML), que mostrou correlação (risco relativo=2,5) com a incidência de GVHD crônica.

A análise do polimorfismo dos genes reguladores de citocinas mostrou que os genótipos de TNF- α ³⁰⁸, IFN- γ ⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592} e TGF- β 1^{+869, +915} não foram associados ao risco aumentado de GVHD aguda e rejeição do enxerto, em 106 doadores e 109 receptores avaliados, enquanto o fenótipo de baixo produtor de IL-6, do doador e receptor, mostrou associação estatisticamente significativa ao risco de ocorrência de GVHD crônica. O acompanhamento da variação dos níveis séricos de sIL-2R, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β 1 dos receptores até 15 semanas pós-transplante revelou que os níveis médios de sIL-2R e IL-10 foram maiores no grupo que desenvolveu GVHD aguda (776,4 \pm 65,5 pg/ml e 10,9 \pm 3,3 pg/ml) em relação ao grupo que não desenvolveu esta doença (541,1 \pm 17,3 pg/ml e 2,5 \pm 2,2 pg/ml). Os níveis de sIL-2R no período de pega do enxerto (1.165,0 \pm 179,2 pg/ml vs. 578,0 \pm 47,2 pg/ml) e ao tempo da GVHD aguda (926,4 \pm 142,5 pg/ml vs. 496,5 \pm 48,7pg/ml) também diferiram entre os grupos. A cinética destas citocinas também revelou que os níveis de TNF- α e TGF- β 1 foram correlacionados com o desenvolvimento de GVHD aguda, quando analisados em determinados períodos

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor, Universidade Estadual de Campinas-SP

Correspondência para: Cármino Antonio de Souza
Hemocentro de Campinas – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Distrito de Barão Geraldo
Caixa Postal 6198; CEP: 13083-970 – Campinas-SP – Brasil
Fax: (19) 3788-8600 – Tel: (19) 3788-8729 – e-mail: carmino@unicamp.br

de tempo após o transplante. Nas primeiras semanas após o transplante, os níveis de TNF- α foram maiores no grupo com GVHD aguda que no grupo sem a doença ($72,7 \pm 2,6$ pg/ml vs. $38,1 \pm 1,7$ pg/ml). Nas últimas semanas, os níveis de TGF- β 1 foram menores no grupo que desenvolveu a GVHD aguda ($7,5 \pm 1,4$ ng/ml), comparado ao grupo sem a doença ($17,0 \pm 1,6$ ng/ml). Assim sendo, o monitoramento dos níveis séricos de sIL-2R, IL-10, TNF- α e TGF- β 1 no pós-transplante poderia fornecer ao clínico um indicativo do risco de GVHD aguda, enquanto a genotipagem de IL-6⁻¹⁷⁴ poderia oferecer um novo método para identificar pacientes ao risco de GVHD crônica.

Summary

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the chosen treatment for many hematological diseases and primary immunodeficiencies. Donor selection has been based on the serological definition of HLA-A and -B, in the definition of HLA-DRB1 and -DQB1 by DNA-based molecular methods and in the standard mixed lymphocyte culture (MLC). Even so, graft-versus-host disease (GVHD) is still one of several complications, and this occurs in approximately 35% of HLA-identical bone marrow recipients. The objective of this study was to evaluate the prognostic power of rejection and GVHD development in laboratorial assays: 1 – standard mixed lymphocyte culture (MLC) and potentialized (MLCp) with exogenous cytokines; 2 – typing of cytokine regulator genes, by PCR-SSP; and 3 – follow-ups of serum level cytokines of transplanted patients using quantitative enzyme-linked immunoassays. From August 1994 to February 2002, 118 transplantations with HLA-identical donors which were performed in the Hematological and Hemotherapy Center at Campinas State University (Unicamp) were analyzed. Until September 2002, the data were updated. In the MLCp, the donor lymphocyte response versus receptor cells (DxR) was augmented 1.9 and 4.1 times with IL-4 (100 ng/mL) and IL-2 (10 ng/mL) supplementation, respectively. However, the donor response versus their own cells (DxD) also augmented, 2.0 and 6.4 times, respectively. Since this treatment also stimulated an increase of autologous responses, MLCp did not have advantages in relation to standard method (MLC) that showed a correlation (relative risk=2.5) with the incidence of chronic GVHD. Cytokine gene polymorphism analysis showed that TNF- α ⁻³⁰⁸, IFN- γ ⁻⁸⁷⁴, IL-6⁻¹⁷⁴, IL-10^{-1082, -819, -592}, and TGF- β 1^{+869, +915} genotypes were not associated to increased risk of acute GVHD and rejection, in 106 donors and 109 evaluated recipients, whereas the IL-6 low producer phenotype of donor and recipient showed significant statistical

association to chronic GVHD. The follow-up of sIL-2R, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β 1 recipient serum levels during 15 weeks post-transplant showed that sIL-2R and IL-10 average levels were higher in the group with acute GVHD (776.4 ± 65.5 pg/ml and 10.9 ± 3.3 pg/ml), than in the group without the disease (541.1 ± 17.3 pg/ml and 2.5 ± 2.2 pg/ml). Soluble IL-2 receptor levels at the engraftment and at onset of acute GVHD were also different between the groups with and without acute GVHD ($1,165.0 \pm 179.2$ pg/ml vs. 578.0 ± 47.2 pg/ml and 926.4 ± 142.5 pg/ml vs. 496.5 ± 48.7 pg/ml), respectively. The cytokine kinetics also showed that TNF- α and TGF- β 1 levels were associated with acute GVHD, when post-transplant periods were analyzed. In the first weeks after the transplant, TNF- α levels were higher in the group with acute GVHD than those in the group without the disease (72.7 ± 2.6 pg/ml vs. 38.1 ± 1.7 pg/ml). In the last weeks, TGF- β 1 levels were lower in the group with acute GVHD (7.5 ± 1.4 ng/ml) than those in the group without the disease (17.0 ± 1.6 ng/ml). Therefore, the monitoring of sIL-2R, IL-10, TNF- α , and TGF- β 1 serum levels after the transplant may provide the physician an indication of acute GVHD risk, while the IL-6⁻¹⁷⁴ genotype may offer a new method for identifying patients at increased risk of chronic GVHD.

Recebido: 19/02/2003

Aceito: 22/02/2003