

Artigo / Article

Associação dos níveis de citocinas no pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas com a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro Aguda

Association of cytokine levels with acute graft versus host disease following full match allogeneic stem cell transplantation

Jeane E. L. Visentainer¹Sofia R. Lieber^{2,3}Lígia B. L. Persoli^{2,3}Afonso C. Vigorito²Francisco J. P. Aranha²Kátia A. B. Eid²Gislaine B. Oliveira²Eliana C. M. Miranda²Cármio A. de Souza²

Este estudo foi realizado para investigar se os níveis séricos de sIL-2R, TNF-alfa, IFN-gama, IL-6, IL-10 e TGF-beta1 estavam associados com o desenvolvimento de DECH (Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro) aguda. Os níveis de citocinas foram seqüencialmente mensurados por Elisa em 13 pacientes que haviam sido submetidos ao transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas. Os níveis de sIL-2R e IL-10 da 1^a a 15^a semanas pós-transplante foram significativamente maiores no grupo que desenvolveu DECH aguda que naquele sem a doença. Os níveis de sIL-2R aumentaram em direta correlação com a pega do enxerto e ao tempo do DECH aguda, enquanto os níveis de IL-10 aumentaram transitoriamente pós-transplante. A média da concentração de TNF-alfa nas primeiras semanas após o transplante foi maior no grupo que desenvolveu DECH aguda. Além disso, uma queda dos níveis de TGF-beta1 após a pega esteve significativamente associada à DECH aguda. Nenhuma correlação foi encontrada entre DECH aguda e as outras citocinas investigadas. Estes resultados suportam a idéia de que um balanço entre as citocinas derivadas de linfócitos T auxiliares do tipo 1 e 2 pode ser importante no desenvolvimento e controle da DECH aguda. Embora os níveis de sIL-2R, TNF-alfa, IL-10 e TGF-beta1 tenham sido correlacionados com a DECH aguda, os níveis de sIL-2R ao tempo da pega podem prover um melhor parâmetro para a detecção precoce de DECH aguda após o transplante alogênico. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(3):166-174.

Palavras-chave: Citocinas; transplante de células-tronco hematopoiéticas; DECH.

Introdução

A doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa) ainda representa uma das principais complicações após o transplante de células hematopoiéticas alogênicas. Esta doença comumente ocorre quando as células imunocompetentes do doador reconhecem uma disparidade genética do hospedeiro.

Muitas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento de DECHa após o transplante como uma cascata durante a

ativação seqüencial de monócitos e células T.¹ As citocinas inflamatórias liberadas durante o regime de condicionamento possuem um papel fundamental na ativação de células T, tais como o TNF-alfa, IL-1 e/ou IL-6. Estas citocinas podem promover a ativação de células T derivadas do doador, as quais secretam várias outras citocinas, predominantemente, IL-2 e IFN-gama. Estas induzem respostas de células T citolíticas, NK e de fagócitos mononucleares com produção de IL-1 e TNF-alfa. Existem fortes evidências de que estas citocinas e a citotoxicidade mediada por células levariam à

¹Universidade Estadual de Maringá – Maringá-PR.

²Universidade Estadual de Campinas – São Paulo-SP.

³Universidade Presbiteriana Mackenzie – São Paulo-SP.

Correspondência para: Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas
Av. Colombo, 5790 – Zona 07
87020-900 – Maringá-PR – Brasil
Tel.: (44) 3261-4864/Fax: (44) 3261-4931
E-mail: jelvisentainer@uem.br

destruição dos tecidos alvos durante a DECHa. Vários estudos têm demonstrado o aumento destas citocinas e/ou de seus receptores no soro de pacientes com DECHa.²⁻¹¹ Contudo, citocinas antiinflamatórias, tais como IL-10 e TGF-beta1, têm também sido associadas à DECH.¹¹⁻¹⁴

Neste trabalho, foram mensuradas as concentrações séricas de sIL-2R, TNF-alfa, IFN-gama, IL-6, IL-10 e TGF-beta 1 em 13 receptores de transplantes alogênicos e, então, analisada a correlação entre os níveis de citocinas e o desenvolvimento de DECHa.

Casística e Métodos

Pacientes

Treze pacientes consecutivos, submetidos ao transplante alogênico de células hematopoiéticas de doador HLA-identico no Centro de Transplante de Medula Óssea da Unicamp, de abril a dezembro de 2000, e com amostras de soro disponíveis, participaram neste estudo, após consentimento formalizado. As características dos pacientes estão listadas na Tabela 1. Os indivíduos transplantados foram seguidos durante 15 semanas após transplante. Este estudo foi realizado de acordo com o Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Campinas / SP, sob nº: 200/2000.

Todos os pacientes foram preparados para o transplante de acordo com protocolos apropriados para sua doença. A

medula óssea foi obtida dos doadores por procedimentos padrões. Todos os doadores de células do sangue periférico (CPP) receberam a droga rhG-CSF (Granulokine; Roche®, SP, Brazil) por injeções subcutâneas, como descrito anteriormente.¹⁵ O dia 0 para os receptores foi definido como o dia de infusão da medula ou CPP. Um resumo dos regimes de condicionamento e profilaxia da DECH está mostrado na Tabela 1. As células da medula e CPP foram analisadas para CD34+ e subpopulações de células T por citometria de fluxo. Anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson® Immunocytometry Systems (San Jose, CA, USA). A pega de neutrófilos foi considerada ter ocorrido nos primeiros dois dias consecutivos com uma contagem absoluta de neutrófilos $0,5 \times 10^9/L$. A pega de plaquetas foi considerada ter ocorrido nos primeiros sete dias consecutivos com uma contagem de plaquetas $20,0 \times 10^9/L$ sem transfusão de plaquetas. A pega foi também documentada por aspiração de medula, biópsia e citogenética. Os graus de DECH aguda e crônica foram estabelecidos usando-se os critérios de Glucksberg et al¹⁶ e Shulman et al,¹⁷ respectivamente.

Os pacientes foram internados em quartos privados equipados com filtros HEPA. Transfusões de hemácias irradiadas e plaquetas, assim como antibióticos de amplo espectro associados a agentes antifúngicos foram administrados quando indicados. A administração de ceftazidime foi iniciada tão logo a contagem de neutrófilos tinha diminuído para $0,5 \times 10^9/L$, e substituição de antibióticos foi realizada quando

Tabela 1
Características dos pacientes (N=13)

ID	Idade/Sexo	Diagnóstico	Regime de Condicionamento	Fonte de células	Profilaxia DECHa	Seguimento (dias)	M	MRT
1	44/F	LMC	CY + BU	CPP	CsA + MTX	125	M	DECHa e falência de múltiplos órgãos
2	32/F	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	248	V	
3	25/M	AAG	CY	MO	CsA+MTX	237	V	
4	37/M	LMC	CY + BU	MO	CsA+MTX	194	V	
5	37/M	AAG	CY + BU	MO	CsA+MTX	115	M	Infecção bacteriana
6	42/M	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	39	M	DECHa e falência de múltiplos órgãos
7	32/M	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	383	V	
8	43/M	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	148	M	
9	30/F	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	100	V	
10	30/M	LMC	CY + BU	CPP	CsA+MTX	104	M	DECHa
11	30/M	LMA	CY + BU	CPP	CsA+MTX	133	M	Persistência da doença primária
12	26/M	AAG	CY	MO	CsA+MTX	165	V	
13	42/F	AAG	CY	MO	CsA+MTX	70	M	Infecção viral

ID= identificação; F= feminino; M= masculino; LMC= leucemia mielóide crônica; AAG= anemia aplástica grave; LMA= leucemia mielóide aguda; CY= Ciclofosfamida; BU= Bussulfan; CPP= células progenitoras periféricas; MO= medula óssea; CsA= Ciclosporina; MTX= Metotrexato; M= morto; V= vivo; MRT= mortalidade relacionada ao transplante; DECHa= Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro aguda

indicada por culturas e pelo curso clínico, mantendo-se o paciente com os antibióticos até a contagem de granulócitos alcançar $1,0 \times 10^9/L$. T

odos os pacientes receberam gancyclovir (5 mg/kg/dia três vezes por semana) após a pega da medula óssea como uma medida profilática para a infecção pelo citomegalovírus até o dia 75 pós-transplante. O suporte nutricional, incluindo a nutrição intravenosa foi realizado para assegurar um adequado balanço nutricional.

Mensuração de citocinas no soro

Amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente e centrifugadas dentro de duas horas da coleta de sangue, e os soros foram estocados a $-80^{\circ}C$ para análises posteriores. Estes soros foram obtidos antes do início do regime de condicionamento, após este regime, a cada semana até 15 semanas após o transplante, e até a morte ou recaída destes pacientes.

Os níveis de citocinas no soro foram determinados usando kits comerciais Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (Elisa) para sIL-2R, IFN-gama, IL-6, TNF-alfa, IL-10 e TGF-beta1 (BioSource®, Nivelles, Belgium, Europe).

Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção foram os seguintes: 16 $\mu g/mL$ para sIL-2R, 4 $\mu g/mL$ para IFN-gama, 2 $\mu g/mL$ para IL-6, 3 $\mu g/mL$ para TNF-alfa, 1 $\mu g/mL$ para IL-10 e 2 $\mu g/mL$ para TGF-beta1. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SSPS 10.0 e os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de DECHa. Somente graus iguais ou maiores que II foram considerados como DECHa. Os níveis médios de citocinas foram calculados em diferentes períodos de tempo: pré-condicionamento, pós-condicionamento e, semanalmente, após o transplante até 15 semanas, morte ou recaída do paciente, e expressos como médias SEM (*standard error mean*). Além disso, os níveis de citocinas foram comparados entre os indivíduos que desenvolveram infecção viral e/ou doença viral e/ou morreram devido a causas relacionadas ao transplante e aqueles que não, usando o teste-T para amostras independentes. Testes de comparação múltipla (Anova e de Tukey) foram aplicados com o objetivo de comparar a mudança dos níveis de citocinas dentro dos dois grupos (com e sem DECHa), e em quatro períodos de tempo {pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega (2ª a 4ª semana após o transplante) e pós-pega}.

Resultados

Seguimento clínico

A DECHa ocorreu em cinco pacientes: grau II em dois pacientes, grau III em um e grau IV em dois. Três pacientes desenvolveram DECH crônica: um apresentou a forma limitada e os outros dois a forma extensa. Dois pacientes desenvolveram rejeição. Todos os pacientes desenvolveram infecção bacteriana e cinco pacientes apresentaram infecção viral e/ou a doença viral após a transplantação. As principais causas de mortalidade relacionadas ao transplante foram listadas na Tabela 1.

Níveis séricos de citocinas no pré e pós-condicionamento

Não houve diferença significativa nos níveis pré-condicionamento entre os grupos com e sem DECHa para todas as citocinas testadas.

O efeito do regime de condicionamento do transplante também foi analisado. Os níveis pós-condicionamento não diferiram dos níveis pré-condicionamento em ambos os grupos. Os níveis de TNF-alfa e IL-6 somente aumentaram em dois pacientes no pós-condicionamento, mas eles não foram significativamente associados à DECHa.

Níveis séricos de citocinas em pacientes com e sem DECH após o transplante

A Tabela 2 sumariza os níveis médios de sIL-2R, TNF- α , IFN-gama, IL-6, IL-10 e TGF-beta1 durante 15 avaliações após o transplante (1ª-15ª semanas). Os níveis médios de sIL-2R e IL-10 diferiram significativamente entre os grupos com e sem DECHa. Contudo, importantes variações temporárias foram também observadas em outras citocinas. A Figura 1 apresenta o perfil de citocinas no soro de 13 pacientes transplantados.

Tabela 2
Níveis séricos médios de citocinas em pacientes com e sem DECH aguda (1ª - 15ª semanas pós-transplante)

Citocina	DECH aguda (ausência) N=8		DECH aguda (presença) N=5		P
	Média	SEM	Média	SEM	
sIL-2R	541,1 $\mu g/mL$	17,3	776,4 $\mu g/mL$	65,5	< 0,01
TNF-alfa	70,2 $\mu g/mL$	10,9	71,9 $\mu g/mL$	9,8	NS
IFN-gama	4,7 $\mu g/mL$	1,5	3,9 $\mu g/mL$	1,8	NS
IL-6	22,9 $\mu g/mL$	5,4	58,9 $\mu g/mL$	21,3	NS
IL-10	2,5 $\mu g/mL$	1,2	10,9 $\mu g/mL$	3,3	< 0,05
TGF-beta1	13,2 $\eta g/mL$	1,4	12,4 $\eta g/mL$	1,9	NS

SEM= erro médio padrão
DECH= Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
NS= não significativo

Níveis de sIL-2R e DECHa após o transplante alogênico

A Figura 1a mostra a cinética desta citocina em ambos

os grupos de pacientes, incluindo os períodos pré e pós-condicionamento. Em pacientes com DECHa, a concentração média de sIL-2R no soro começa a aumentar na segun-

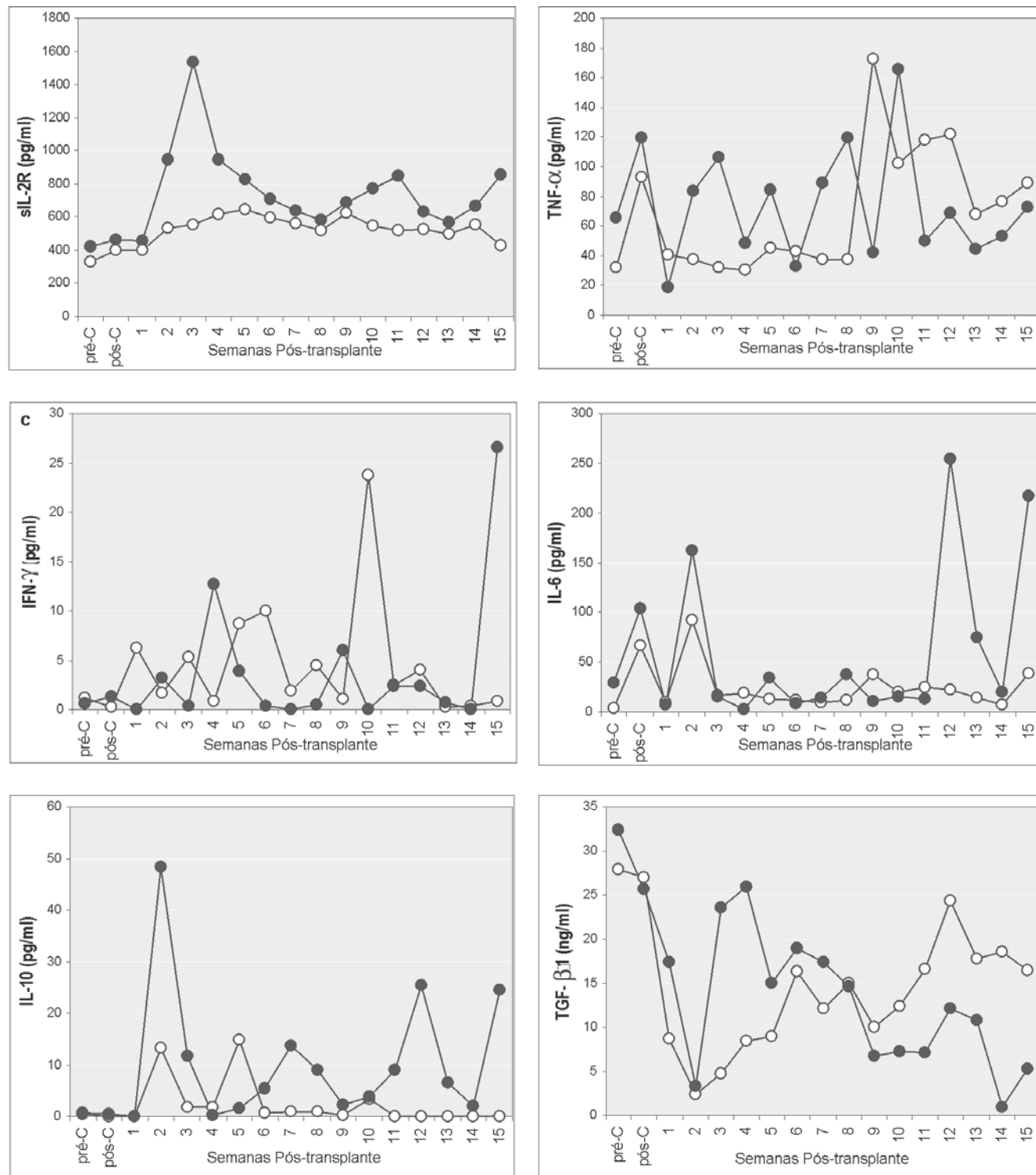


Figura 1. Cinética dos níveis de sIL-2R (a), TNF-α (b), IFN-γ (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF-β 1 (f) no soro de pacientes com DECH aguda de graus II a IV (círculos fechados) e sem DECH aguda (círculos abertos), nos períodos pré-condicionamento (pré-C), pós-condicionamento (pós-C) e pós-transplante

da semana após a transplantação e alcança um pico de 1.535,1 pg/mL no dia +18.

O tempo médio de surgimento de DECHa foi de 51 dias após a transplantação (dia 18 a 81). Quando nós comparamos os níveis médios de citocina no soro ao tempo da DECHa nestes grupos, o nível médio de sIL-2R foi maior comparado àquele medido na ausência da doença (926,4 ± 142,5 g/mL vs. 496,5 ± 48,6 g/mL; $p < 0,01$).

Os níveis médios de sIL-2R foram também acessados em diferentes períodos de tempo: pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega e pós-pega. Níveis aumentados de sIL-2R no período de pega estiveram associados ao desenvolvimento de DECHa. A Figura 2 mostra que os níveis de sIL-2R aumentaram no período de pega em ambos os grupos. Contudo, este aumento foi maior no grupo com a DECHa (1.165,0 ± 179,2 pg/mL vs. 578,0 ± 47,2 pg/mL; $p < 0,05$).

Níveis de TNF-alfa e a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico

Picos de TNF-alfa foram vistos em pacientes que desenvolveram DECHa e crônica, e rejeição, mas não puderam ser associados especificamente à DECHa (Tabela 2). As análises também mostraram que os níveis de TNF-alfa não foram diferentes no tempo da DECHa nem em diferentes períodos de tempo: pré-condicionamento, pós-condi-

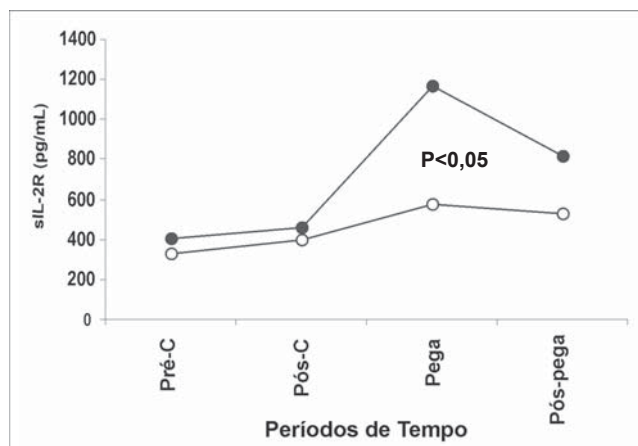


Figura 2. Níveis de sIL-2R no soro de 13 pacientes recebendo transplante de células progenitoras hematopoiéticas, medidos em 4 períodos de tempo. Os pacientes foram agrupados de acordo com a ocorrência (círculos fechados) ou ausência (círculos abertos) de DECH aguda de graus II a IV. Os níveis de sIL-2R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

cionamento, pega e pós-pega. Todavia, a Figura 1b mostra que os níveis séricos de TNF-alfa durante a 2ª e 8ª semanas após o transplante foram significativamente maiores no grupo com DECH a (72,7 ± 2,6 pg/mL vs. 38,1 ± 1,7 pg/mL; $p < 0,01$). Após este período, picos de TNF-alfa também apareceram em pacientes sem DECHa, mas com GVHD crônica e rejeição.

Níveis de IFN-gama e a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico

Os níveis de IFN-gama não foram diferentes entre os grupos com e sem DECHa (Tabela 2). Os níveis de IFN-gama não diferiram nem ao tempo da DECHa, nem nos períodos de tempo do pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega e pós-pega.

A cinética dos níveis médios de IFN-gama em pacientes transplantados está representada na Figura 1c.

Níveis de IL-6 e a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico

Não foram observadas associações significativas entre os níveis de IL-6 e DECHa (Tabela 2). Contudo, a cinética desta citocina (Figura 1d) mostra alguns picos após o transplante no grupo com a DECHa. Quando a análise considerou os níveis de IL-6 no tempo da DECHa e nos períodos de pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega e pós-pega, nenhuma associação pôde ser observada. Picos de IL-6 foram também observados em pacientes que desenvolveram DECH crônica e rejeição.

Níveis de IL-10 e a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico

A Tabela 2 mostra que o nível médio de IL-10 foi maior em pacientes com DECHa que em pacientes sem a doença. Porém, esta diferença estatística não se manteve quando a análise comparou os níveis de IL-10 durante a DECHa, nem nos períodos de pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega e pós-pega. A Figura 1e mostra a cinética de IL-10 em pacientes após a pega. Picos de IL-10 ocorreram em vários períodos após o transplante no grupo com a DECHa. Uma análise individual dos níveis de IL-10 em pacientes que desenvolveram a DECHa mostrou picos desta citocina durante a DECH em três pacientes que morreram poucos dias mais tarde. Um deles morreu com DECHa e falência de múltiplos órgãos, outro com DECHa e infecção viral e o terceiro com DECHa grave. Dois pacientes que não tiveram um aumento destes níveis ao tempo da DECHa permaneceram vivos durante o período de estudo. Somente um paciente morreu com DECHa e falência de múltiplos órgãos sem mudanças nos níveis de IL-10.

Níveis de TGF-beta1 e a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico

Os níveis de TGF-beta1 não diferiram entre os grupos

durante a DECHa, nos períodos de pré-condicionamento, pós-condicionamento, pega e pós-pega. Contudo, a Figura 1f mostra uma interessante cinética desta citocina. Após a transplantação, os níveis de TGF-beta1 em ambos os grupos caíram e começaram a aumentar após a 3ª semana de transplante.

No grupo que não desenvolveu a DECHa, estes níveis retornaram aos níveis básicos após 12 semanas. Todavia, naqueles que desenvolveram DECHa, estes níveis começaram a cair novamente ao redor de nove semanas. Assim, os níveis médios de TGF-beta1 foram verificados da 1ª a 8ª semanas após o transplante.

Nas primeiras semanas, os níveis de TGF-beta1 foram maiores em pacientes com DECHa que naqueles sem a doença ($17,0 \pm 2,4$ ng/mL vs. $10,3 \pm 1,8$ ng/mL; $p < 0,05$). Nas últimas semanas de observação, os níveis de TGF-beta1 foram menores no grupo com DECHa ($7,1 \pm 1,3$ ng/mL vs. $16,5 \pm 1,7$ ng/mL; $p < 0,01$).

Níveis séricos de citocinas em pacientes com outras complicações seguindo o transplante

Nós analisamos a associação dos níveis pós-transplante de citocinas com a ocorrência de outras complicações (DECH crônica e rejeição). Somente os níveis de TNF-alfa mostraram um aumento nos pacientes que desenvolveram estas complicações quando comparados àqueles que não desenvolveram, embora não estatisticamente significativo ao nível de 5% ($93,5 \pm 18,3$ pg/mL vs. $56,4 \pm 6,6$ pg/mL; $p = 0,07$).

Análises cinéticas das citocinas endógenas durante infecções bacterianas não mostraram nenhum aumento significativo após o transplante. Contudo, os níveis de IFN-gama estiveram significativamente aumentados em pacientes com infecção viral e/ou doença viral ($8,8 \pm 2,7$ pg/mL vs. $1,5 \pm 0,6$ pg/mL; $p = 0,01$).

Com relação às outras citocinas investigadas, nenhuma correlação foi encontrada.

Relação entre os níveis de citocinas e a mortalidade relacionada ao transplante

Quando comparamos os níveis médios de citocinas entre a 1ª e a 15ª semanas após o transplante entre pacientes que morreram devido a causas relacionadas ao transplante e aqueles que não, houve diferença significativa na produção de sIL-2R ($731,6 \pm 46,3$ pg/mL vs. $536,2 \pm 24,5$ pg/mL; $p < 0,01$), IL-6 ($10,9 \pm 3,4$ pg/mL vs. $2,5 \pm 1,2$ pg/mL; $p < 0,05$) e IL-10 ($55,9 \pm 19,1$ pg/mL vs. $14,2 \pm 2,5$ pg/mL; $p < 0,05$).

Discussão

A importância da cascata de citocinas após o condicionamento e durante a DECH pós-transplante está bem estabelecida. Medidas dos níveis séricos de citocinas em

pacientes com DECH têm sido usadas para investigar o papel das citocinas na patofisiologia desta doença.

Neste estudo, nós demonstramos que em pacientes com DECHa, as concentrações séricas de sIL-2R, TNF-alfa e IL-10 aumentaram significativamente após o transplante.

A concentração sérica elevada de sIL-2R tem sido relatada em indivíduos com DECHa após o transplante por vários pesquisadores.⁴⁻⁷ Os níveis de sIL-2R puderam também ser associados ao desenvolvimento de DECHa neste estudo. Estes níveis foram associados ao tempo da pega em concordância com prévios relatos.¹⁸⁻²¹ De acordo com Kobayashi et al,²⁰ este fenômeno pode ser devido à administração de G-CSF, o qual parece aumentar a liberação de sIL-2R. No presente estudo, contudo, não foram utilizados fatores de crescimento após o transplante. Desta forma, outros fatores podem ser os responsáveis pelo aumento de sIL-2R no soro, como infecções durante o período granulocitopênico,²⁰ síndrome de pega²² e ativação imune durante a DECHa. Não observamos correlação entre os níveis de sIL-2R após o transplante e infecções bacterianas ou virais. Em nosso estudo, o aumento de sIL-2R ocorreu em paralelo com o início da pega hematopoiética em ambos os grupos. Contudo, os níveis de sIL-2R em pacientes com DECHa foram maiores que em pacientes sem a doença. Assim, a concentração sérica de sIL-2R após o transplante, provavelmente, reflete a magnitude da ativação das células T derivadas do doador.

Em pacientes que desenvolveram DECHa de graus II-IV esta ativação pode ter sido mais intensa, promovendo assim o aumento de sIL-2R. Além disso, a associação observada entre os níveis de sIL-2R e a mortalidade relacionada ao transplante pode ter ocorrido devido ao tratamento imunossupressor não ter controlado a produção de sIL-2R e, conseqüentemente, a DECH.

O TNF-alfa é conhecido como um importante mediador de lesões teciduais durante a rejeição de enxertos e DECH, e o seu papel nas respostas alorreativas de células T tem sido demonstrado.^{2,3}

Na presente análise, nenhuma correlação foi observada quando os níveis de TNF-alfa foram comparados entre os grupos com e sem DECHa. Contudo, o perfil cinético desta citocina mostrou um aumento de TNF-alfa nas primeiras semanas após o transplante. Kayaba et al² também relataram um aumento de TNF-alfa durante sete semanas após o transplante no grupo com a DECHa. Este achado pode ser devido ao papel inflamatório desta citocina na fase inicial da DECHa. Os níveis de TNF-alfa também aumentaram em pacientes que desenvolveram DECH crônica e rejeição. Holler et al²³ também descreveram níveis séricos aumentados de TNF-alfa precedendo as principais complicações do transplante, além da DECHa. O TNF-alfa pode ser liberado de tecidos do hospedeiro durante a lesão tecidual causada pelo condicionamento²⁴ e após o transplante induzido por outras citocinas. Neste estudo, embora níveis aumentados

de TNF-alfa tenham sido encontrados no soro de dois pacientes, após o regime de condicionamento, nossos resultados não puderam confirmar o papel do condicionamento na liberação desta citocina. Este fato pode ser explicado pelo regime de condicionamento sem irradiação corpórea total, o qual tem sido associado à liberação de TNF-alfa.²⁵

O papel do IFN-gama na expressão de DECH é complexo. Níveis aumentados de IFN-gama têm sido observados no soro de pacientes com DECHa,^{3,7,8} infecções⁸ e regeneração hematopoiética.²² Em acordo com dados de Sakata et al,²⁶ nossos resultados não puderam mostrar uma associação entre os níveis pós-transplante de IFN-gama e DECHa. Estudos em animais têm mostrado que, embora IFN-gama tenha funções imunestimulatórias, ele não parece essencial para a rejeição aguda de enxertos alogênicos de camundongos.²⁷ Contudo, nós observamos uma associação entre os níveis altos de IFN-gama e infecção viral e/ou doença viral, confirmando seu papel como um mediador essencial da imunidade inata a patógenos virais.

A citocina pró-inflamatória IL-6 tem sido associada a complicações relacionadas ao transplante, incluindo a DECHa.^{3,9,10} Neste estudo, embora os níveis médios de IL-6 tenham aumentado em pacientes com DECHa, eles não puderam ser associados especificamente com o desenvolvimento de DECHa, talvez devido ao pequeno número de pacientes avaliados.

Picos de IL-6 também foram observados em pacientes com DECH crônica e rejeição, sugerindo que IL-6 possa indiretamente influenciar na DECH e/ou rejeição pela promoção da ativação imune. Esta reação inflamatória pode contribuir para a mortalidade relacionada ao transplante observada em pacientes com altos níveis de IL-6. Em contraste ao relatado por Schwaighofer et al²⁸ e Liem et al,¹² os níveis de IL-6 não foram associados a infecções bacterianas ou virais neste estudo.

O papel da IL-10 na patogênese da DECHa tem sido estabelecido,^{12,13} e uma correlação entre IL-10 e o curso fatal dos pacientes após o transplante tem sido relatada.²⁹⁻³¹ Nós confirmamos um aumento dos níveis de IL-10 associado com a DECHa e observamos que a maioria dos pacientes que morreram com DECHa e complicações relacionadas apresentava níveis aumentados desta citocina durante a DECH. A principal função de IL-10 parece ser limitar e regular as respostas inflamatórias.³² Então, os níveis de IL-10 encontrados durante a DECH podem ter ocorrido para inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, se o efeito imunossupressor de IL-10 é benéfico para a DECH ou não, permanece controverso, porque a alta produção de IL-10 poderia levar a uma imunodeficiência funcional e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de graves complicações. Além disso, um estudo mostrou que IL-10 poderia inibir respostas imunes se presente durante a exposição ao Ag, mas poderia falhar na supressão de respostas mediadas por células T CD8+ ativadas.³³ Este fato poderia explicar nos-

so resultados que mostraram altos níveis de IL-10 durante a fase efetora da DECHa, mas não o controle do progresso da doença.

Após o transplante, TGF-beta1 atingiu baixos níveis e começou a aumentar após 18 a 25 dias. Liem et al¹⁴ também observaram esta cinética e uma forte correlação entre os níveis de TGF-beta1 e as contagens de plaquetas e células brancas. Baixos níveis de TGF-beta1 na fase de recuperação podem ser explicados pela baixa contagem de plaquetas ou células brancas neste período. Além disso, embora nossos resultados não tenham mostrado diferentes níveis de TGF-beta1 entre os grupos com e sem DECHa, eles sugeriram uma queda dos níveis de TGF-beta1 após a pega em pacientes que desenvolveram a DECHa.

Estes resultados estão de acordo com Imamura et al,³⁴ que encontraram um decréscimo na expressão de RNAm para TGF-beta1 em células mononucleares do sangue periférico durante a DECHa. Esta citocina possui um importante papel regulatório na resposta imune, e baixos níveis podem não ser suficientes em suprimir a reatividade da célula T e outros tipos celulares, resultando na DECHa como sugerido por Liem et al.¹⁴ De fato, esta hipótese parece explicar o desenvolvimento de DECHa em nosso grupo de pacientes.

É possível que todas estas citocinas juntas possam causar progressão da DECH de diferentes maneiras em cada indivíduo, e um balanço entre estas citocinas parece ser importante no controle da DECH. Baseado em nossos resultados, embora os níveis de sIL-2R, TNF-alfa, IL-10 e TGF-beta1 tenham sido correlacionados à DECHa, os níveis de sIL-2R no momento da pega poderiam prover um melhor parâmetro para a detecção precoce de DECHa após o transplante alogênico.

Abstract

This study was performed to investigate whether the serum levels of sIL-2R, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TGF-beta1 are associated with the development of acute GVHD. Serum cytokine levels were sequentially measured by sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (Elisa) in 13 patients who had received full match allogeneic stem cell transplantation. Serum sIL-2R and IL-10 levels from the 1st to the 15th week post transplantation were significantly higher in the group who developed acute GVHD than in the group without acute GVHD. Soluble IL-2R levels increased in direct correlation to engraftment and onset of acute GVHD, while IL-10 levels increased transiently following transplantation. The mean TNF-alpha concentration in the first weeks after transplantation was augmented in the group that developed acute GVHD. Furthermore, a drop in TGF-beta1 levels after the engraftment was significantly associated to acute GVHD. No correlation was found between acute GVHD and the other evaluated cytokines. These results support the idea that a balance between cytokines derived from type 1 and type 2 T-helper cells may be important in the development and control of acute

GVHD. Although sIL-2R, TNF-alpha, IL-10, and TGF-beta1 levels, correlated with acute GVHD, sIL-2R levels at the engraftment may provide a better parameter for the early detection of acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005;27(3):166-174.

Key words: Cytokines; stem cell transplantation; GVHD.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Universidade Estadual de Campinas e Capes. Os autores agradecem à Dra. Neiva Celan Gonsales e à Máira Helena Cittadino Favarelli pela assistência técnica na realização dos imunoenaios enzimáticos. Finalmente, os autores agradecem também aos pacientes, sem os quais este estudo não teria sido possível.

Referências Bibliográficas

- Ferrara JLM. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9:299-306.
- Kayaba H, Hirokawa M, Watanabe A et al. Serum markers of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S40-44.
- Imamura M, Hashino S, Kobayashi H et al. Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α in graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:745-751.
- Miyamoto T, Akashi K, Hayashi S et al. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:185-190.
- Grimm J, Zeller W, Zander AR. Soluble interleukin-2 receptor serum levels after allogeneic bone marrow transplantation as a marker for GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:29-32.
- Kami M, Matsumura T, Tanaka Y et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor after bone marrow transplantation: a true marker of acute graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 2000; 38:533-540.
- Nakamura H, Komatsu K, Ayaki M et al. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in patients with graft-versus-host disease after human bone marrow transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S45-50.
- Niederwieser D, Herold M, Woloszczuk W et al. Endogenous IFN-gamma during human bone marrow transplantation. *Transplantation* 1990;50:620-625.
- Symington FW, Symington BE, Liu PY et al. The relationship of serum IL-6 levels to acute graft-versus-host disease and hepatorenal disease after human bone marrow transplantation. *Transplantation* 1992;54:457-462.
- Abdallah AN, Boiron JM, Attia Y et al. Plasma cytokines in graft vs. host disease and complications following bone marrow transplantation. *Hematol Cell Ther* 1997;39:27-32.
- Min CK, Lee WY, Min DJ et al. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(10):935-940.
- Liem LM, van Houwelingen HC, Goulmy E. Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation. *Transplantation* 1998;66:863-871.
- Remberger M, Ringdén O. Serum levels of cytokines after bone marrow transplantation: increased IL-8 levels during severe veno-occlusive disease of the liver. *Eur J Haematol* 1997; 59:254-262.
- Liem LM, Fibbe WE, van Houwelingen HC et al. Serum transforming growth factor- β 1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 1999;67:59-65.
- Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JFC et al. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:1.145-1.151.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A. Clinical manifestation of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-314.
- Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinic pathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980;69:204-217.
- Kobayashi S, Imamura M, Hashino S et al. Clinical relevance of serum soluble interleukin-2 receptor levels in acute and chronic graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 1997; 28:159-169.
- Foley R, Couban S, Walker I et al. Monitoring soluble interleukin-2 receptor levels in related and unrelated donor allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:769-773.
- Kobayashi S, Imamura M, Hashino S et al. Possible role of granulocyte colony-stimulating factor in increased serum soluble interleukin-2 receptor- α levels after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 1999;33:559-566.
- Visentainer JEL, Lieber SR, Persoli LBL et al. Serum cytokine levels in patients with acute GVHD after sibling donors allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [abstract]. *Hum Immunol* 2002; 63(suppl.1):S47. Abstract 88.
- Takatsuka H, Takemoto Y, Yamada S et al. Complications after bone marrow transplantation are manifestations of systemic inflammatory response syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:419-426.
- Holler E, Kolb H, Moller A et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:1.011-1.016.
- Remberger M, Ringden O, Markling L. TNF levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop aGVHD. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:99-104.
- Holler E, Kolb H J, Mittermueller J et al. Modulation of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor α (TNF- α) release in the course of pre-transplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF α (MAK 195F). *Blood* 1995;86:890-899.
- Sakata N, Yasui M, Okamura T 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 Transplant* 2001;27:1.153-1.161.
- Steiger JU, Nickerson PW, Hermle M et al. Interferon- γ receptor signaling is not required in the effector phase of the alloimmune response. *Transplantation* 1998;65:1.649-1.656.
- Schwaighofer H, Herold M, Schwartz T et al. Serum levels of interleukin 6, interleukin 8, and C-reactive protein after human allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994; 58:430-436.

29. Hempel L, Körholz D, NuBbaum P, et al. High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:365-368.
30. Baker KS, Roncarolo MG, Peters C et al. High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplantation recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:1.123-1.129.
31. Takatsuka H, Takemoto Y, Okamoto T et al. Predicting the severity of graft-versus-host disease from interleukin-10 levels after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1.005-1.007.
32. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5.530-5.539.
33. Groux H, Bigler M, de Vries JE et al. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 160: 3.188-3.193.
34. Imamura M, Tanaka J, Hashino S et al. Immunopathogenesis of GVHD. *Transplant Proc* 1996;28:1.181-1.183.

Avaliação: Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 03/08/2005

Aceito após modificações: 01/09/2005