

Daniela de Oliveira Pinto

**ACOMPANHAMENTO PÓS TRANSPLANTE DE  
CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS: À  
PROCURA DE BIOMARCADORES DA DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA**

Tese de doutorado submetida à Pós-Graduação do Instituto Nacional de Câncer, visando à  
obtenção do grau de Doutor em Oncologia

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ACOMPANHAMENTO PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOÉTICAS: À PROCURA DE BIOMARCADORES DA DOENÇA DO  
ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Aluna: Daniela de Oliveira Pinto

Orientadora: Eliana Abdelhay

Rio de Janeiro

2010

P659a Pinto, Daniela de Oliveira.

Acompanhamento pós transplante de células tronco hematopoéticas : à procura de biomarcadores da doença do enxerto contra hospedeiro aguda / Daniela de Oliveira Pinto. - Rio de Janeiro: INCA, 2010.

161 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ), 2010. Orientador: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay.

1. Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas. 2. Doença Enxerto-Hospedeiro. 3. Marcadores Biológicos. I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck. II. Título.

CDD 616.027

Acompanhamento pós transplante de células tronco hematopoéticas: à procura  
de biomarcadores da doença do enxerto contra hospedeiro

**Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2010.**

---

**Dra. Eliana Abdelhay, INCA**

---

**Dr. João Paulo de Biaso Viola**

---

**Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan**

---

**Dr. Ângelo Maiolino**

---

**Dra. Russolina Benedeta Zingali**

*Ao meu filho,  
Davi Gandra*

*Ao meu marido,  
João Paulo Dias*

## AGRADECIMENTOS

Essa é a parte mais difícil de escrever, porque são tantos agradecimentos que é passível esquecer alguém. Então se me esqueci de você, me perdoe.

. Agradeço a minha orientadora Eliana Abdelhay, por tudo. Por ser a orientadora maravilhosa que é. Por muitas vezes ter sido mãe de todos nós do laboratório... Enfim, agradeço por todos esses anos de carinho e dedicação.

. A Gabi, minha aluna preferida. Como eu te disse várias vezes, eu não sei o que seria da minha vida sem você. Obrigada por tudo!

. A Lu, pelos conselhos na hora certa, pelos momentos de diversão na hora errada... O laboratório é muito mais divertido com você por perto.

. A Rê, por todas as nossas conversas, por nossos desentendimentos, por toda ajuda prestada em todos os momentos. Você é um exemplo pra muita gente, e você pode não acreditar, mas quando digo pra você que você é chatinha, é porque eu gosto muito de você. Muito mesmo!

. A Amandita, por ouvir minhas reclamações e me ajudar sempre! Ah, e agora trazer a sua cocada “contrabandeada”, aplacando um pouco a minha fissura por doces no fim da tese.

. Ao André, pelas conversas profissionais e não profissionais... Por me apresentar a *Paloma*, pelos momentos de diversão, pelos seus conselhos sobre escova progressiva... Ah, e por estar disposto a ir comprar chocolates comigo, para diminuir um pouco o estresse do fim de tese para nós dois!

. A Barbarela, pelo exemplo de competência e amizade. Mas não sintam mais medo de mim não... Como você mesma falou, sou que nem coca-cola: só faço pressão!

. A Stephy, que parou de falar o seu “mimimi”, e assim eu parei de perturbá-la. E se mostrou uma pessoa maravilhosa, com quem posso dividir minhas garrafas de Jose Cuervo!

. A Carol, que saiu do laboratório e tá fazendo muita falta.

- . A Nara, pelos conselhos sérios e conversas fiadas na volta pra casa.
- . A Bernadete, por tudo... pelo carinho, paciência, amizade, ajuda... Existem pessoas maravilhosas no mundo e você com certeza é uma delas.
- . A Danielli Oliveira, pela ajuda na interpretação com os dados de imunogenética, e pela amizade e colaboração que surgiu entre nós.
- . A Maria Claudia, pela amizade, colaboração e por estar sempre disposta a ajudar em tudo o que eu precisasse.
- . A Marcia Matos, pela coleta das biopsias de pele, indispensáveis para o cumprimento deste trabalho.
- . A equipe clínica do CEMO, em especial aos enfermeiros do hospital dia e da internação do CEMO, pela coleta das amostras, e aos médicos Simone, Rita de Cássia e Alexandre, pela ajuda dispensada sempre que possível.
- . A Fernanda e Telma, que estão sempre dispostas a conversar e ajudar!
- . Aos meus pais, Sérgio e Fátima.
- . A minha amiga irmã, Elaine, pelos 24 anos de amizade. Eu amo você, amiga.
- . Ao meu amigo Leo, que mesmo distante continua torcendo por mim!
- . A Jane Buena, pessoa fundamental na minha vida, que me deu a tranqüilidade necessária para que eu seguisse em frente o meu caminho e conseguisse terminar meu doutorado.
- . Ao João, a quem posso dedicar grande parte deste esforço... Tem uma música que fala sobre tudo que sinto por você... e o que melhor define este sentimento de amor e gratidão são essas estrofes: Precious love, you held my life within your hands, created everything I am, taught me how to live again... My love, whenever I was insecure, you built me up and made me sure, you gave my pride back to me.
- . Ao meu filho Davi, pelo amor incondicional. Você é o responsável por tudo isso. Amo você do fundo do meu coração.



## RESUMO

A doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa) é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade pós-transplante de células tronco hematopoéticas (TCTHs). É uma doença mediada por fatores imunológicos, que é definida como uma enfermidade sistêmica que rapidamente progride, caracterizada por imunossupressão e injúria tissular em vários órgãos como pele, fígado e intestinos. Uma vez que os sintomas clínicos da DECHa são caracterizados por uma inflamação sistêmica do organismo, estudos sobre a DECHa têm como alvo moléculas presentes na atividade inflamatória. Citocinas e quimiocinas estão diretamente envolvidas no recrutamento de leucócitos, e participam ativamente na DECHa. Apesar de algumas moléculas serem sugeridas como possíveis marcadores da DECHa, estes dados ainda não são aplicados na clínica. Sendo assim, propusemos um estudo mais amplo da doença a procura de biomarcadores que pudessem ser utilizados precocemente como marcadores da DECHa. Neste sentido, estudamos amostras de pele e sangue de 100 pacientes submetidos ao transplante entre dezembro de 2005 e março de 2009, para diferentes variáveis em dias pré-determinados no pós-transplante. Nós observamos que o aumento das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 no plasma e das quimiocinas IP-10 e IL-8 no D+14 está associado a um aumento do risco de desenvolver DECHa. Além disso, uma análise das populações celulares no acompanhamento pós-transplante mostrou uma correlação entre a porcentagem de linfócitos B, células NK e DECHa. Pacientes mostram risco aumentado para DECHa quando tem elevada porcentagem de células B logo após o TCTH e à medida que a porcentagem de células NK aumentam, sofrem decréscimo da população B. Além disso, vimos também que linfócitos B são marcadores da doença. Finalmente em uma análise proteômica das células mononucleares do sangue, verificamos que existem 30 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECHa no dia do diagnóstico da doença e doadores saudáveis. Destas, destacamos a galectina-1, a proteína DJ-1, a proteína calreticulina e a proteína 14-3-3 $\zeta$  que estão envolvidas em diversos processos de sinalização celular. Nossos resultados sugerem que várias moléculas podem ser utilizadas como marcadores da DECHa.

## ABSTRACT

The acute graft-versus-host disease (aGVHD) is the major cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (HSCTs). It is a disease mediated by immune factors, which is defined as a systemic disease that progresses rapidly, characterized by immunosuppression and tissue injury in various organs such as skin, liver and gut. Since the clinical symptoms of aGVHD are characterized by an inflammation of the body, several studies about aGVHD has focused in molecules of inflammatory activity. Cytokines and chemokines are directly involved in leukocytes recruitment, and are supposed to participate in aGVHD. Although some of these molecules are suggested as possible biomarkers of aGVHD, these data are not yet applied in the clinic. Therefore, we proposed a more extensive study of the disease to search for biomarkers that could be used as early markers of aGVHD. We studied samples of skin and blood from 100 patients who underwent transplantation between December 2005 and March 2009, for different clinical and biological variables, in pre-determined days after transplantation. We observed that the increase of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-5 and the chemokines MCP-1 and IL-8 at D+14 is associated with an increased risk of developing aGVHD. An analysis of cell populations in post-transplant showed a correlation between the percentage of B lymphocytes, NK cells and aGVHD. Patients showed an increased risk to development aGVHD when they had a high percentage of B cells soon after transplantation, show a decrease of this percentage while NL cells increase. Finally in a proteomic analysis of blood mononuclear cells, we found that there are 30 differentially expressed proteins between patients with aGVHD on day of diagnosis and healthy donors. Of these, we highlight the galectin-1, DJ-1, calreticulin and 14-3-3  $\zeta$  proteins that are involved in various cell signaling processes. Our results suggest that various molecules can be used as markers of GVHD.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** – Anemia Aplástica Severa
- ACN** – Acetonitrila
- AF** – Anemia de Fanconi
- APCs** – do inglês, *Antigens presentating cells* – Células apresentadoras de antígenos
- APS** – do inglês *amonium persulfate* – persulfato de amônio
- ATG** – Antitimoglobulina
- BSA** – Albumina do Soro Bovino
- BU** – Bussulfan
- CSA** – Ciclosporina
- CY** – Ciclofosfamida
- DECHa** – Doença do enxerto contra hospedeiro aguda
- DECHc** – Doença do enxerto contra hospedeiro crônica
- DMA** – Doença maligna avançada
- DMP** – Doença maligna precoce
- DNM** – Doença não maligna
- DTT** – Dithiothereitol
- ECP** – do inglês, *extracorporeal photopheresis* – Fotoferese extracorpórea
- EDTA** – Ácido Etileno Diamino Tetracético
- EGTA** – Ácido Tetracético Etilenoglicol
- FK** – Tacrolimuns
- FLU** – Fludarabina
- GE** – General Electric
- HCl** – Ácido clorídrico
- HLA** – do inglês *Human Leukocyte Antigen* – Antígeno Leucocitário Humano
- HIMAP** – do inglês *Human Interactome Map* – mapa de interatoma humano
- HPN** – Hemagobinúria Paroxística Noturna
- IEF** – Isoeletrofocalização
- IFN** – Interferon
- IL** – Interleucina
- IPG** – Gradiente de pH imobilizado
- IPI** – do inglês *Internacional Protein Index* – Índice internacional de proteínas
- KCl** – Cloreto de potássio
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – di-Hidrogenofosfato de Potássio

**LBA** – Leucemia bifenotípica aguda

**LH** – Linfoma de Hodgkin

**LM** – Linfomas e mielomas

**LLA** - Leucemia Linfoblástica Aguda

**LLC** – Leucemia Linfóide Crônica

**LMA** – Leucemia Mielóide Aguda

**LMC** – Leucemia Mielóide Crônica

**LMMC** – leucemia mielomonocítica crônica

**LMMJ** – leucemia mielomonocítica juvenil

**LNH** – Linfoma não Hodgkin

**mA** – miliampere

**MALDI –TOF** – do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry* – Espectrometria de massa com sistema de desordem por ionização utilizando um laser assistido por uma matriz e detecção através do tempo de voo.

**MEL** – Melphalan

**mg** – miligrama

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**MHC** – do inglês, *Major Histocompatibility Complex* – Complexo maior de histocompatibilidade

**mL** – mililitro

**mM** – milimolar

**MMF** – Micofenolato mofetil

**MO** – Medula óssea

**MP** – Metilprednisolona

**MS** – do inglês *mass spectrometry* – espectrometria de massas

**MTX** – Metotrexate

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**NAF** – Fluoreto de Sódio

**NCBI** – do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information* – Centro nacional de informação em biotecnologia

**NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de amônio

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** . Fosfato (mono) ácido de sódio

**NK** – do inglês, *Natural Killer cells* – Células Matadoras Naturais

**nM** – nanomolar

**ng** – nanograma  
**OR** – do inglês, *odds ratio* – chance de risco  
**OS** – do inglês, *overall survival* – sobrevida global  
**PBS** – Solução Salina Tamponada com Fosfato  
**pI** – Ponto Isoelétrico  
**PM** – Peso Molecular  
**RR** – do inglês, *relative risk* – risco relativo  
**SCUP** – sangue de cordão umbilical e placentário  
**SMD** – Síndrome Mielodisplásica  
**SP** – Sangue periférico  
**SPM** – Sangue periférico mobilizado  
**TBI** – do inglês *total body irradiation* – irradiação corpórea total  
**TCTH** – Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas  
**TFA** – Ácido Trifluoracético  
**TGI** – Trato gastrointestinal  
**TNF** – do inglês, *tumor necrosis factor* – Fator de necrose tumoral  
**TR** – Tampão de rehidratação  
**TRIS** – Tris-hidroxi-metil-aminometano  
**V** – Volt  
**µg** – micrograma  
**µL** – microlitro  
**µM** – micromolar  
**°C** – graus celsius  
**2-D** – Bidimensional

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Lesões eritromatosas observadas na palma da mão e na planta dos pés de pacientes submetidos ao TCTHs, caracterizando estadiamento de pele grau I a II. ....	7
<b>Figura 2:</b> Lesões eritodérmicas com formação de bolhas observadas na face de um paciente submetido ao TCTHs, caracterizando estadiamento de pele grau IV.....	7
<b>Figura 3:</b> Fluxograma do tratamento da DECH aguda após o seu diagnóstico (Dia 0). ....	8
<b>Figura 4:</b> Quimiocinas inflamatórias e seus receptores.....	13
<b>Figura 5:</b> O modelo de três fases da DECHa. ....	14
<b>Figura 6:</b> Quimiocinas e seus receptores nos órgãos alvo da DECHa. ....	18
<b>Figura 7:</b> Mecanismos de injúria pela infiltração tissular de células T aloreativas.....	20
<b>Figura 8:</b> Porcentagens das variáveis clínicas e biológicas dos pacientes submetidos ao TCTH. ....	39
<b>Figura 9:</b> Ocorrência de DECH aguda de acordo com a compatibilidade de HLA.. ....	41
<b>Figura 10:</b> Frequência da DECH aguda por órgão.. ....	42
<b>Figura 11:</b> Diferenças significativas encontradas na análise univariada.....	43
<b>Figura 12:</b> Sobrevida global.. ....	46
<b>Figura 13:</b> Distribuição dos níveis séricos de algumas citocinas de acordo com os diferentes dias de acompanhamento.....	48
<b>Figura 14:</b> Distribuição dos níveis séricos de algumas citocinas nos diferentes dias, de acordo com o aparecimento ou não de DECHa.....	50
<b>Figura 15:</b> Padrão da expressão da citocina IFN- $\gamma$ em biópsias de pele.. ....	55
<b>Figura 16:</b> Padrão da distribuição de TNF- $\alpha$ em biópsias de pele.....	57
<b>Figura 17:</b> Distribuição dos níveis séricos de algumas quimiocinas de acordo com os diferentes dias de acompanhamento.. ....	62
<b>Figura 18:</b> Distribuição dos níveis séricos de algumas quimiocinas nos diferentes dias, de acordo com o aparecimento ou não de DECHa.....	63
<b>Figura 19:</b> - Padrão da expressão do receptor de quimiocina CXCR3 em biópsias de pele... ..	67
<b>Figura 20:</b> Padrão da expressão da quimiocina IP-10 em biópsias de pele.....	69
<b>Figura 21:</b> Percentual de linfócitos Th e Tc no acompanhamento pós TCTH.....	72
<b>Figura 22:</b> Percentual de células T CD4+ CD25+ em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH.....	74

<b>Figura 23:</b> Percentual de células NK em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH.....	75
<b>Figura 24:</b> Percentual de células B em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH.....	76
<b>Figura 25:</b> Padrões bidimensionais do paciente 52 antes (D-8) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+28).....	82
<b>Figura 26:</b> Padrões bidimensionais do paciente 90 antes (D0) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+28).....	83
<b>Figura 27:</b> Padrões bidimensionais do paciente 75 antes (D+28) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+45) e após o diagnóstico, ainda com a doença (D+100).....	84
<b>Figura 28:</b> Padrões bidimensionais dos pacientes com DECHa, comparado com pool de doadores saudáveis. ....	105
<b>Figura 29:</b> Distribuição das proteínas diferencialmente expressas, identificadas por espectrometria de massas em classes de função.....	107
<b>Figura 30:</b> Mapa de interação da proteína Galectina 1 (LGALS1).....	108
<b>Figura 31:</b> Mapa de interação da proteína DJ-1 (PARK7).....	109
<b>Figura 32:</b> Mapa de interação da proteína Calreticulina (CALR).....	110
<b>Figura 33:</b> Mapa de interação da proteína 14-3-3ζ (YWHAZ).....	111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Critérios para o estadiamento dos órgãos com DECH aguda. ....	6
<b>Tabela II:</b> Características dos pacientes e seu transplante .....	37
<b>Tabela III:</b> Chance de risco para a ocorrência de DECH aguda, de acordo com as diferentes variáveis. ....	40
<b>Tabela IV:</b> Chance de risco para a ocorrência de DECH aguda, de acordo com as diferentes variáveis clínicas e com o órgão acometido de DECHa.....	44
<b>Tabela V:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das citocinas nos diferentes dias.. ....	51
<b>Tabela VI:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das citocinas nos diferentes dias, separado por órgão acometido pela DECHa .52	
<b>Tabela VII:</b> Relação entre IFN- $\gamma$ e IL-5 no D+14, e variáveis clínicas .....	53
<b>Tabela VIII:</b> Graduação da intensidade de coloração obtida nas imunohistoquímicas para INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nas biópsias de pele dos pacientes submetidos ao TCTH .....	59
<b>Tabela IX:</b> Padrão de expressão das moléculas IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram ou não DECHa.....	60
<b>Tabela X:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das quimiocinas nos diferentes dias.....	64
<b>Tabela XI:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das quimiocinas nos diferentes dias, separado por órgão acometido pela DECHa. ....	65
<b>Tabela XII:</b> Relação entre MCP-1 e regime de condicionamento .....	66
<b>Tabela XIII:</b> Graduação da intensidade de coloração obtida nas imunohistoquímicas para IP-10 e CXCR-3 nas biópsias de pele dos pacientes submetidos ao TCTH.....	70
<b>Tabela XIV:</b> Padrão de expressão das moléculas CXCR3 e IP-10 em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram ou não DECHa .....	71
<b>Tabela XV:</b> Relação de células NK/células B.....	76
<b>Tabela XVI:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento das populações celulares nos diferentes dias.....	77
<b>Tabela XVII:</b> Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento das populações celulares nos diferentes dias e com o órgão afetado pela DECHa.....	78



<b>Tabela XVIII:</b> Spots protéicos identificados por espectrometria de massas. ....	85
<b>Tabela XIX:</b> Proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECHa e doadores saudáveis. ....	105
<b>Tabela A1:</b> Dados clínicos dos pacientes deste estudo .....	146

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. A doença do enxerto contra hospedeiro .....	2
2. A doença do enxerto contra hospedeiro aguda .....	5
2.1. Terapia primária.....	8
2.2. Terapia secundária .....	9
2.3. Profilaxia da DECHa .....	11
3. Bases moleculares da DECHa .....	11
4. Biomarcadores como auxiliar no diagnóstico da DECH aguda .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
1. Objetivo principal da tese .....	24
2. Objetivos específicos .....	24
<b>METODOLOGIA</b> .....	25
1. Definição de critérios de inclusão .....	26
2. Pacientes e amostras .....	26
3. Obtenção de dados clínicos-biológicos dos pacientes.....	26
4. Coleta de biópsia de pele .....	26
5. Análise patológica .....	27
6. Coleta de sangue periférico .....	27
7. Preparação das amostras para dosagem de citocinas e quimiocinas e para a obtenção dos extratos protéicos totais.....	27
7.1. Preparação dos extratos totais de proteínas .....	27
7.2. Preparação das amostras para dosagem de citocinas e quimiocinas.....	28
8. Análise das populações celulares no sangue periférico.....	29
9. Imunohistoquímica .....	29
10. Análise proteômica .....	30
10.1. Precipitação do Extrato Protéico .....	30
10.2. Análise proteômica .....	31
10.3. Análise dos Padrões Proteômicos.....	32
10.4. Processamento e preparação das amostras para análise por espectrometria de massas .....	32
10.5. Espectrometria de Massa .....	32
10.6. Análise e identificação em Bancos de Dados .....	33

10.7. Análise in silico das proteínas .....	33
11. Análise estatística .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
1. Análise dos dados clínicos-biológicos dos pacientes e identificação de características que se relacionem a DECHa - .....	36
1.1. Características dos pacientes .....	36
1.2. Desenvolvimento da DECH .....	38
1.3. Relações entre as variáveis clínicas e biológicas e o risco de desenvolver DECH aguda nos diferentes órgãos.....	42
1.4. Sobrevida global .....	45
2. Análise das citocinas como biomarcadores da DECHa.....	47
2.1. Citocinas no plasma.....	47
2.2. Análise da relação entre o aumento das concentrações de citocinas e o risco de desenvolver DECHa .....	49
2.3. Análise da relação entre o aumento das concentrações das citocinas e o risco de desenvolver DECHa nos diferentes órgãos-alvo da doença .....	51
2.4. Correlação do aumento dos níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$ com as diferentes variáveis clínicas-biológicas .....	53
2.5. Análise das citocinas em biópsias de pele .....	54
3. Análise das quimiocinas como biomarcadoras da DECH aguda - .....	61
3.1. Quimiocinas no plasma.....	61
3.2. Análise da relação entre o aumento das concentrações de quimiocinas e o risco de desenvolver DECHa .....	61
3.3. Análise da relação entre o aumento das concentrações das quimiocinas e o risco de desenvolver DECHa nos diferentes órgãos-alvo da doença .....	64
3.4. Correlação do aumento dos níveis séricos de algumas quimiocinas com as diferentes variáveis clínicas e biológicas.....	65
3.5. Análise de algumas quimiocinas em biópsias de pele .....	66
4. Análise das populações celulares no sangue periférico pós TCTH e seu envolvimento na DECH aguda .....	72
4.1. Recuperação imunológica.....	72
4.2. Associação entre a razão de células NK e células B e a ocorrência de DECHa.....	76
4.3. Populações celulares como marcadoras da DECHa .....	77
4.4. Análise multivariada .....	78

5. Análise proteômica das células mononucleares de sangue periférico de pacientes acompanhados no pós TCTH .....	79
5.1. Perfil protéico das células mononucleares dos pacientes acompanhados no pós TCTH.....	80
5.2. Identificação de possíveis biomarcadores de DECHa por análise comparativa entre os padrões bidimensionais das amostras de pacientes com a doença e doadores saudáveis.....	104
5.3. Análise <i>in silico</i> das proteínas identificadas.....	107
5.3.1. Categorização funcional das proteínas identificadas .....	107
5.3.2. Predição de interações moleculares das proteínas diferencialmente expressas identificadas .....	108
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>144</b>
Anexo 1 .....	145
Anexo 2 .....	152
Anexo 3 .....	154
Anexo 4 .....	158

# *INTRODUÇÃO*

### **1. A doença do enxerto-contrá-hospedeiro.**

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) vem sendo utilizado há pouco mais de 50 anos como terapia para o tratamento de doenças hematológicas benignas e malignas, doenças autoimunes e diversos outros tipos de doenças, inclusive alguns tipos de tumores sólidos.

O TCTH consiste em injetar células-tronco em pacientes imunossuprimidos. Estas células podem ter origem na medula óssea, sangue periférico mobilizado ou sangue de cordão umbilical. Quanto ao tipo de doador, o TCTH pode ser um transplante autólogo, onde o doador é o próprio paciente, ou transplante alogênico, onde o doador é alguém compatível geneticamente (sistema HLA) com o paciente, podendo ser um parente ou alguém não relacionado, e por fim o transplante singênico, que ocorre entre irmãos gêmeos.

Um dos problemas que persistem no TCTHs é a doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH). A maioria dos receptores do transplante alogênico desenvolve algum grau de DECH aguda após o transplante. A DECH é uma doença mediada por fatores imunológicos, e é definida como uma enfermidade sistêmica que rapidamente progride, caracterizada por imunossupressão e injúria tissular em vários órgãos como pele, fígado e intestinos (Baker *et al.*, 1996; Ferrara & Deeg, 1991).

A doença pode se manifestar da forma aguda ou crônica (Vogelsang *et al.*, 2003). A DECH aguda (DECHa) ocorre nas primeiras semanas após o transplante, sendo mais freqüente e severa quando os HLAs não são idênticos ou no transplante não-relacionado. A DECH crônica (DECHc) é uma doença ainda pouco conhecida. Antigamente o paciente que apresentasse a doença depois de 100 dias pós-transplante ou que fosse uma DECHa continuada até depois do dia 100 pós-transplante era classificado como DECHc. Na verdade, hoje em dia sabemos que a DECHa pode se manifestar após três meses do transplante, assim como os sintomas da DECHc podem se desenvolver juntamente com a aguda, e ocorrerem concomitantemente (Filipovich *et al.*, 2005).

A primeira descrição da DECH veio de experimentos documentados em roedores que tiveram reconstituição hematopoética após irradiação letal da medula (Billingham *et al.*, 1959). Animais que receberam enxertos de células-tronco singênicas, ou seja, células retiradas de animais isogênicos recuperaram-se da toxicidade da radiação (doença primária) e aparentavam normalidade. Animais que receberam os enxertos de células-tronco de descendência diferente, ou seja, com

diferentes MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, complexo maior de histocompatibilidade) recuperaram-se da doença primária, porém desenvolveram uma doença secundária, que hoje é conhecida como DECH. Estes animais desenvolveram eritema, diarreia, doença hepática, e todos esses sintomas levavam a uma destruição severa que resultava em morte. Anos antes, outros pesquisadores descreveram o efeito enxerto-*versus*-leucemia em animais. Animais que receberam células-tronco alogênicas e células leucêmicas conseguiram se livrar da leucemia após o transplante, enquanto os animais que receberam células singenéticas não ficaram curados da leucemia (Barnes *et al.*, 1956).

Billingham postulou as condições necessárias para a indução da DECH (Billingham, 1966). Primeiro, o enxerto deve conter células imunologicamente competentes. Segundo, o hospedeiro tem que parecer estranho para o enxerto e deve ser capaz de estimular as células do doador. E, finalmente, o sistema imune do hospedeiro deve ser incapaz de gerar resposta imune (evitando assim a rejeição do enxerto), por um tempo suficiente para que o enxerto seja sensibilizado e o ataque imunológico ao hospedeiro seja aumentado. Diferenças antigênicas estimulam os linfócitos do doador a atacar primeiramente as células epiteliais e membranas mucosas na pele, trato gastrointestinal e ductos biliares.

Ainda que Billingham tenha desenvolvido este modelo para descrever as observações vistas após o TCTHs, existem outras várias descrições para apresentações incomuns da DECH. Por exemplo, pacientes imuno-incompetentes, tais como pacientes que tenham recebido quimioterapia intensiva produzindo aplasia ou crianças que nasceram com imunodeficiências, desenvolveram DECH após receberem transfusões de sangue contaminadas com linfócitos viáveis (Ayha *et al.*, 1998). Esses pacientes não podem aumentar a resposta imunológica suficientemente para rejeitar esses linfócitos e por isso podem desenvolver DECH. A DECH transfusional difere da DECH seguida ao transplante alogênico em um aspecto significante: a DECH transfusional causa aplasia da medula e muitos destes pacientes apresentam não somente *rashes*, diarreia e elevada função hepática, mas também apresentam pancitopenia. A DECH causada pela transfusão de sangue pode ser prevenida com a remoção ou a destruição dos linfócitos que são recolhidos através de irradiação ou filtração. Existem ainda outros casos de DECH não relacionadas com o transplante de células-tronco hematopoéticas, tais como DECH relacionada ao transplante de fígado, ou de pâncreas (Taylor *et al.*, 2004;

Weinstein *et al.*, 2006). Nos dois casos, são considerados dois fatores como os fatores principais de risco: a idade do receptor do órgão e a correlação dos HLAs.

O MHC é uma região genética definida inicialmente pela rejeição dos enxertos de pele entre camundongos geneticamente incompatíveis. Em humanos, o MHC, conhecido como região do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), compreende cerca de 3Mb localizadas no braço curto do cromossomo 6. Esta região contém cerca de 200 genes (Beck & Trowsdale, 1999; Shiina *et al.*, 1999), dos quais muitos estão envolvidos com resposta imune e alguns exibem um extensivo polimorfismo genético. Os genes que codificam moléculas HLA classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP) são os *loci* com maior polimorfismo humano, onde cada *locus* (por exemplo o HLA-B ou DRB1) tem mais de 300 alelos (Marsh, 2000). Os HLAs de classe I estão envolvidos na apresentação de peptídeos para as células T CD8<sup>+</sup> e as moléculas de classe II apresentam antígenos para as células T CD4<sup>+</sup>.

Na DECH, o ataque aos tecidos do receptor do enxerto de células-tronco é mediado pelas células T aloreativas (Hansen *et al.*, 1997; Dennert *et al.*, 1985). Moléculas de HLA têm um efeito maior no transplante, devido ao papel fundamental que desenvolvem na ativação das células T e na aloresposta. Uma quantidade significativa das células T circulantes são aloreativas, isto é, elas reconhecem HLAs estranhos, ou “nonself”. As diferenças estruturais codificadas pelas seqüências de polimorfismos no HLA de classe I e II induzem a ativação das células T e as reações imunológicas mediadas pelas células T aloreativas e pelos anticorpos anti-HLA produzidos pelas células B.

Mesmo com HLAs idênticos entre pacientes e doadores, um grande número de pacientes ainda desenvolvem DECH. Isto está relacionado a diferenças nos antígenos de histocompatibilidade menor. A existência de sistemas de antígenos segregados não-HLA tem sido mostrada em diversos modelos animais. Entretanto, estes antígenos não foram precisamente definidos em humanos (Goulmy *et al.*, 1996). A maioria dos antígenos menores é expressa na superfície celular como peptídeos degradados ligados a moléculas de HLA específicas. Por isso, a seleção de um doador sem familiares é limitada. O paciente tem cerca de 20 a 30% de chances de encontrar um doador compatível entre sua família. Quando não existem doadores compatíveis dentro da própria família, existe a possibilidade de se recorrer à um banco de doadores voluntários ou banco de sangue de cordão umbilical (Vogelsang *et al.*, 2003). Porém, transplantes



alogenêicos não-aparentados aumentam ainda mais a chance do paciente desenvolver a DECH.

## **2. A doença do enxerto-contrá-hospedeiro aguda.**

Mesmo com uma terapia imunossupressiva adequada no pós-transplante, a doença do enxerto-contrá-hospedeiro aguda (DECHa) é ainda a maior causa de morbidade e mortalidade no pós TCTHs, mesmo em pacientes que receberam enxertos com HLA idêntico (Couriel *et al.*, 2004). Mais de 30% dos pacientes que recebem o transplante de células-tronco hematopoéticas de doadores relacionados, ou seja, com HLA idêntico, e a maioria dos pacientes que recebem enxertos de outras fontes, ou seja, doadores não-aparentados, desenvolvem DECHa grau II, independente da profilaxia imunossupressiva (Goker *et al.*, 2001; Gajewski & Champlin, 1996).

A disparidade entre os HLAs é o fator de maior predisposição dos pacientes a desenvolverem a DECHa (Beatty *et al.*, 1985). Porém, outros fatores relevantes têm sido identificados como fatores de predisposição do desenvolvimento da doença, tais como idade do receptor, diferenças de sexo (doadora feminina e paciente masculino), antígeno de histocompatibilidade menor em transplantes HLA relacionados, idade do doador, fonte e dose das células-tronco hematopoéticas, a intensidade do regime de condicionamento, e a profilaxia da DECH (Jacobsohn & Vogelsang, 2007).

O modelo proposto para o aparecimento da DECH aguda é um modelo de três fases (Teshima & Ferrara, 2002). Em um primeiro instante, o regime de condicionamento produz injúria tissular, onde quimiocinas e citocinas inflamatórias são liberadas e as células dendríticas do receptor são ativadas no baço e nos tecidos periféricos. Após a infusão das células-tronco hematopoéticas, as células T do doador reconhecem antígenos do receptor apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) ativadas e fazem uma expansão clonal. Assim, mais quimiocinas e citocinas são liberadas e as células efetoras não específicas como células NK, monócitos e macrófagos são ativados. Na terceira fase, a injúria do tecido ocorre. Queratinócitos morrem por apoptose na pele, fígado e intestinos devido a desequilíbrio entre as citocinas, e as células T auto-reativas do doador atacam o restante do sistema imune do receptor.

As manifestações clínicas da DECHa são, basicamente, dermatite, enterite e hepatite. A graduação clínica da doença é obtida de acordo com o grau de comprometimento da pele, volume de diarreia e níveis de bilirrubina encontradas no

sangue (IBMTR, 1997). A tabela I mostra o sistema de estadiamento da DECHa de acordo com o acometimento dos órgãos.

A pele é um alvo inicial da doença e geralmente é o órgão mais comprometido (Martin *et al.*, 1990), começando pelas palmas, mãos, planta dos pés, orelhas e mucosa oral (Figura 1). Em geral, os achados na pele precedem aos achados no fígado e no trato gastrointestinal. Inicialmente lesões eritematosas são vistas. Em casos mais severos, as manchas se juntam num eritema confluyente (grau III) e pode haver comprometimento da subepiderme, levando a formação de bolhas (grau IV) (Vogelsang *et al.*, 2003) (Figura 2). O principal sinal do envolvimento do trato gastrointestinal é a diarreia, com ou sem sintomas de acometimento do trato gastrointestinal (TGI) alto, como anorexia, náuseas e emese. A forma mais severa de DECH do TGI se manifesta com câimbras abdominais, com sangramento ocasional e paralisação do íleo (Iqbal *et al.*, 2000).

**Tabela I – Critérios para o estadiamento dos órgãos com DECH aguda<sup>a</sup>.**

INDEX	Pele		Fígado		TGI	
	Estágio	Extensão do rash	Estágio	Bilirrubina (mmol/L)	Estágio	Diarreia (mL/d)
<b>A</b>	1	< 25%	0	< 34	0	< 500
<b>B</b>	2	25% - 50%	1-2	34 -102	1-2	550 - 1500
<b>C</b>	3	> 50%	3	103 – 255	3	> 1500
<b>D</b>	4	Bolhas	4	> 255	4	Dor abdominal severa e paralização do íleo.

a – adaptado do IBMTR, 1997

A DECHa no fígado se manifesta por uma hiperbilirrubinemia e aumento da fosfatase alcalina (Arai *et al.*, 2002), e, em menor grau, níveis de transaminases (Akpek *et al.*, 2002). Porém, a elevação isolada dos níveis de fosfatase alcalina pode ser a única manifestação do envolvimento do fígado.

O diagnóstico e gerenciamento da DECH aguda é realizado através de biópsias dos tecidos envolvidos na doença. Embora esteja descrito que as biópsias são desprovidas de sensibilidade e especificidade (Kuykendall *et al.*, 2003), quando elas são positivas, podem ser utilizadas para a confirmação do diagnóstico mesmo com manifestações não específicas, predizendo resultados e guiando a terapia imunossupressiva (Socie *et al.*, 2004).



**Figura 1 – Lesões eritromatosas observadas na palma da mão e na planta dos pés de pacientes submetidos ao TCTHs, caracterizando estadiamento de pele grau I a II.**



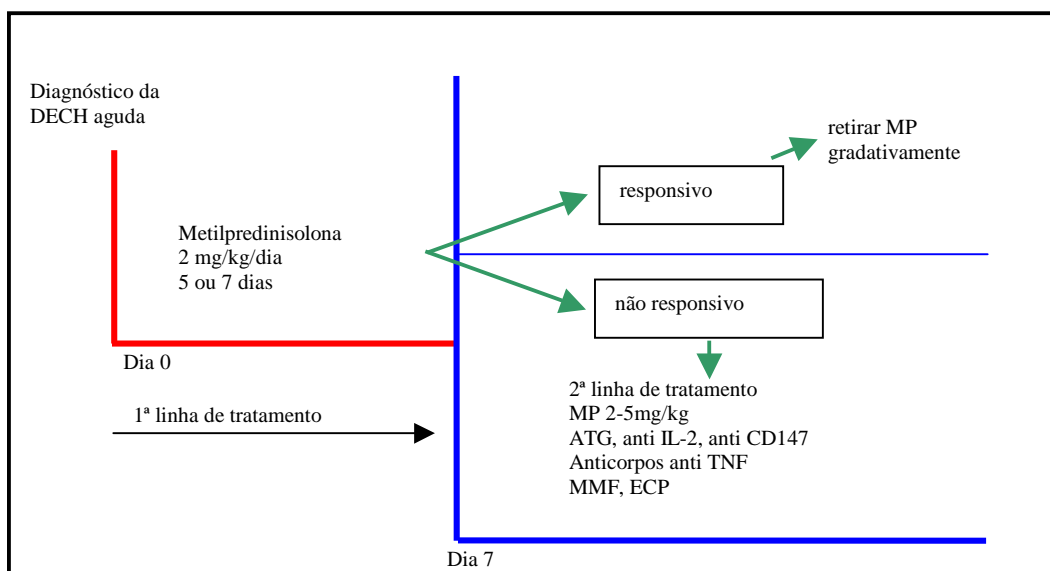
**Figura 2 – Lesões eritrodérmicas com formação de bolhas observadas na face de um paciente submetido ao TCTHs, caracterizando estadiamento de pele grau IV.**

Tanto o tratamento como a prevenção da DECH aguda são baseados na tentativa de interromper o ciclo patofisiológico da doença (modelo de três fases). Todos os tratamentos atuais para a doença afetam mais de um evento neste ciclo através da imunossupressão não específica relativa e de mecanismos anti-inflamatórios. Deve existir sempre o constante balanço e revisão dos benefícios da terapia contra as duas principais complicações que são resultantes da imunossupressão e dos efeitos anti-inflamatórios: infecção e recaída da doença maligna. A recorrência da doença maligna é resultante do bloqueio do efeito benéfico do enxerto-*versus*-leucemia, que está associado à DECH. Então, os benefícios e duração de todas essas terapias precisam ser balanceados constantemente contra as complicações que estas mesmas terapias trazem

para o paciente, colocando a sua vida em risco. Os principais tratamentos contra a DECHa são divididos em duas fases, conforme visualizados na figura 3 e explicados mais adiante.

### **2.1. Terapia Primária**

O gerenciamento inicial da DECHa usualmente é realizado com esteróides. Esteróides, em combinação com ciclosporina (Martin *et al.*, 1990; Jacobsohn & Vogelsang., 2002) ou com tacrolimus (Przepiorka *et al.*, 1999) têm sido considerados como terapia padrão para a administração da DECH aguda (Martin *et al.*, 1990; Przepiorka *et al.*, 1999). Seus mecanismos de ação ainda não são claros, mas estão relacionados com a supressão da atividade de citocinas. A maioria dos centros utiliza metilprednisolona (MP) em doses de 2,0 mg/kg. Altas doses também são efetivas, porém causam diversos efeitos colaterais e danos metabólicos severos, incluindo hiperglicemia, retenção de líquidos, enfraquecimento muscular e aumento na taxa de complicações infecciosas (Martin *et al.*, 1990; Jacobsohn & Vogelsang., 2002). Entretanto, uma vez que seja notada melhora clínica, não existe nenhum consenso relativo à melhor forma de diminuir os esteróides nos pacientes responsivos, mas quanto mais rápida a diminuição, pode resultar em uma menor complicação relacionada aos esteróides (Hings *et al.*, 1993).



**Figura 3 – Fluxograma do tratamento da DECH aguda após o seu diagnóstico (Dia 0).** Primeira linha de tratamento consiste na administração de metilprednisolona (MP) 2 mg/kg/dia. No Dia 7, se não houver resposta do paciente, é iniciada uma segunda linha de tratamento, onde além da MP continuada, são associadas uma ou mais terapias, conforme discussão a seguir. Adaptado de Bacigalupo, 2007.

Aproximadamente 50% dos pacientes que são tratados com esteróides na fase inicial da doença alcançam uma resposta parcial ou completa à terapia (Martin *et al.*, 1990). O restante dos pacientes necessitam de uma terapia secundária para o tratamento da DECHa refratária à esteróides.

## **2.2. Terapia Secundária**

Atualmente, não existe nenhum consenso relativo a definição da DECHa refratária à esteróides ou a melhor forma de administrá-la. Numerosos agentes têm sido e continuam sendo avaliados, mas infelizmente com baixos resultados uniformes. A globulina antitimocítica (ATG, do inglês *antithymocyte globulin*) tem sido a forma mais comum de imunossupressão. O ATG se une aos linfócitos T circulantes originando linfopenia e diminuição das respostas imunológicas das células T. Diferentes trabalhos têm mostrado a sua eficácia (Ruutu *et al.*, 1997; Hings *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1992), porém com morbidade e mortalidade significantes, principalmente devido a complicações infecciosas. O ATG pode causar reações febris, hipotensão, trombocitopenia, e em casos raros, reações anafiláticas. Pacientes pré-tratados com ATG podem desenvolver desordens linfoproliferativas no pós-transplante, geralmente associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV). Entretanto, cerca de 20 a 50% dos pacientes melhoram com a administração do ATG, e, no caso da DECH cutânea, são observadas respostas em cerca de 60 a 75% dos pacientes (Deeg, 2007).

Anticorpos monoclonais tais como daclizumab, visilizumab, infliximab e alemtuzumab têm sido avaliados no tratamento e prevenção da DECHa. Daclizumab é um anticorpo monoclonal imunoglobulina G1 (IgG1) que se liga diretamente ao CD25 (Junghans *et al.*, 1990), que é o receptor de IL-2. Assim, este anticorpo compete com o IL-2 na ligação ao seu receptor (CD25) (Queen *et al.*, 1989). O infliximab é um anticorpo monoclonal quimera (camundongo-humano) IgG1 que se liga tanto na subunidade solúvel quanto no precursor de ligação na membrana do TNF- $\alpha$  (Scallon *et al.*, 1995), o maior mediador da terceira fase na patogenia da DECHa. Infliximab inibe uma larga quantidade de atividades biológicas do TNF- $\alpha$  pelo bloqueio da interação destas moléculas com os seus receptores. Ele também pode causar a lise das células que produzem o TNF- $\alpha$  (Scallon *et al.*, 1995). Outro anticorpo humanizado, visilizumab, se liga à cadeia  $\epsilon$  de CD3, o receptor de células T. Visilizumab induz seletivamente a apoptose das células T ativadas (Carpenter *et al.*, 2000), afetando predominantemente a

segunda fase (fase efetora) na patogenia da DECHa. O anticorpo anti-CD52, alemtuzumab, utilizado para a depleção de células T, também tem sido utilizado para o tratamento da DECHa. Como este anticorpo é reativo tanto com células T quanto com células B, o risco de desordens linfoproliferativas associadas à EBV é baixo (Wandrou *et al.*, 2004; Jacobsohn & Vogelsang, 2002). Este anticorpo é utilizado no tratamento da DECHc.

Uma estratégia para aumentar a eficácia dos anticorpos monoclonais ou ligantes biológicos tem sido associá-los a uma toxina (imunotoxina) que pode se grudar na célula-alvo apropriada. Denileucina difitox, que liga ao receptor da IL-2 (CD25), tem recebido considerável atenção. Após a ligação da droga ao CD25, o fragmento catalítico A da toxina é translocado para o citoplasma, interferindo com a síntese protéica da célula, levando a mesma a morte (Ho *et al.*, 2004).

Em paralelo com as variadas experiências com anticorpos monoclonais e imunotoxinas, velhas e novas drogas quimioterapêuticas ou imunomodulatórias têm sido utilizadas no tratamento da DECHa refratária. Micofenolato mofetil (MMF) é o etilester morfolino do ácido micofenólico (MPA) e possui atividade imunossupressiva, assim como atividades antibactericida, antiviral e antifúngica. O composto ativo, MPA, inibe a iosina monofosfato desidrogenase, interferindo assim na síntese de guanosina trifosfato. Como os linfócitos não possuem uma via alternativa para a síntese de guanosina trifosfato, eles são atacados pelo MMF preferencialmente (Deeg, 2007).

Outras drogas também são utilizadas no tratamento da DECHa de acordo com os diferentes centros. Pentostatina, um análogo de nucleosídeo que inibe a adenosina desaminase, é um outro imunossupressor que tem sido utilizado para a administração da DECHa (Vogelsang, 2000). A administração de pentostatina leva a um acúmulo de 2' desoxiadenosina 5' trifosfato, que leva predominantemente às células T e NK a morte.

Uma outra abordagem para o tratamento da DECHa é a fotofereze extracorpórea (ECP, do inglês *extracorporeal photopheresis*), onde o paciente é ligado a uma máquina de aférese e seus leucócitos são recolhidos em uma bolsa. Assim, cerca de  $5 \times 10^9$  leucócitos do paciente são expostos extracorporeamente ao 8-metoxipsoraleno, seguido de radiação UVA antes de retornarem ao paciente (Greinix *et al.*, 2000). A ECP resulta na apoptose de todos os leucócitos ativos dentro das 24 a 48 horas seguintes. As células apoptóticas são utilizadas pelas APCs, e este processo leva a supressão da reatividade das células T, diminuição das citocinas liberadas e indução das células T regulatórias (Foss *et al.*, 2005).

Portanto, existem várias terapias para o tratamento da DECHa. Entretanto, antes mesmo da ocorrência da doença, é iniciada uma profilaxia da DECHa, baseada na administração de agentes imunossupressores.

### **2.3. Profilaxia da DECHa**

A prevenção da DECHa é iniciada antes mesmo do transplante de células-tronco hematopoéticas, e é baseado na imunossupressão. Os primeiros regimes de prevenção eram baseados em uma longa administração de metotrexato (MTX), porém a ciclosporina A (CSA) passou a ser reconhecida com agente imunossupressor que induz menos mucosite, e que possui uma atividade de supressão equivalente ao MTX em prevenir a DECH (Deeg *et al.*, 1997; Storb *et al.*, 1988). A combinação dos dois – uma curta administração de MTX e uma longa administração de CSA – tornou-se o padrão global na profilaxia da DECH, assim como estudos randomizados mostraram diminuição no aparecimento de DECH graus III e IV e subsequente melhora na sobrevida dos pacientes com leucemia e anemia aplástica (Sorrer *et al.*, 2005; Locatelli *et al.*, 2000). A introdução da CSA foi acompanhada das toxicidades específicas da CSA tais como danos renais, hipertensão, tremores e neurotoxicidade (Loughran *et al.*, 1985), o que requer uma terapia de suporte para os danos da CSA, além do monitoramento dos níveis séricos da CSA concomitantemente. No caso de neurotoxicidade, a CSA deve ser suspensa imediatamente.

Novos agentes farmacológicos que interferem com a ativação das células T, como o Tacrolimus (FK506) e o Sirolimus (rapamicina), foram introduzidos nos últimos 10 anos. Em transplantes HLA-idênticos com doador não-relacionado, a combinação de tacrolimus e MTX resultou em significativa redução da incidência de DECH quando comparada com CSA/MTX e uma redução na toxicidade renal e da taxa de recaída, sugerindo que o tacrolimus é uma alternativa apropriada a CSA (Nash *et al.*, 2000).

### **3. Bases Moleculares da DECHa.**

Levando em consideração que a DECHa se manifesta na forma de dermatite, hepatite e enterite, podemos dizer que esta doença nada mais é do que uma inflamação sistêmica do organismo do indivíduo transplantado. Desta forma, as moléculas que atuam no recrutamento dos leucócitos para os sítios de inflamação são as principais candidatas no estudo molecular da DECHa.

O modelo original de migração de leucócitos para os sítios de inflamação é caracterizado por um processo de múltiplos passos (Springer, 1994). Com a inflamação, o tecido libera moléculas de citocinas e quimiocinas, que promovem a ativação das vênulas do tecido inflamado, que consiste num aumento da expressão de moléculas de superfície endotelial, como as selectinas. Além disso, as citocinas funcionam como moléculas quimioattractantes, promovendo a atração dos leucócitos para os sítios de inflamação. Assim, quando os leucócitos são atraídos ao sítio inflamado, ocorre o passo inicial do processo de migração dos leucócitos. Este passo envolve o tateamento e rolamento dos leucócitos pela superfície das vênulas endoteliais ativadas, primeiramente pela interação das selectinas e seus ligantes de carboidratos. Em seguida, os leucócitos que estão rolando encontram quimiocinas ligadas à superfície das vênulas por proteoglicanos. A sinalização que ocorre através dos receptores de quimiocinas presentes nos leucócitos leva a um aprisionamento do leucócito na superfície da vênula (Campbell *et al.*, 1998). A transmigração através da superfície da parede endotelial envolve interações entre as integrinas dos leucócitos e moléculas de adesão (Johnson-Leger & Imhof, 2003). Portanto, várias moléculas são importantes no recrutamento de leucócitos, destacando-se as citocinas e as quimiocinas e seus respectivos receptores.

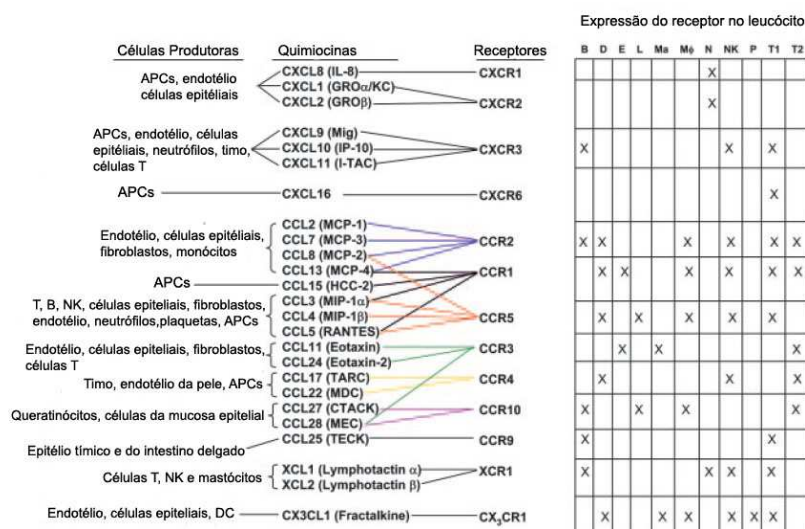
Citocinas é o termo genérico empregado para designar um grupo muito extenso de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Todas as citocinas são pequenas proteínas, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (Wysocki *et al.*, 2005). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ), e fator de transformação de crescimento (TGF  $\beta$ ).

As quimiocinas pertencem a uma grande família de proteínas com cerca de 8-12kD, que tem como a função primária serem moléculas quimioattractantes de leucócitos (Wysocki *et al.*, 2005). Estas proteínas têm funções adicionais em processos como angiogênese, hematopoese e ativação de células do sistema imune. As famílias são subdivididas baseadas no número e na posição do NH<sub>2</sub> – terminal dos resíduos de cisteína. A maior parte das quimiocinas são das subfamílias CC (CCL1-28) e CXC (CXCL1-16), enquanto a família C contém dois membros (XCL1 e XCL2) e a subfamília CX3C apenas um membro (CX3CL1).

Duas classes de quimiocinas foram definidas (Moser *et al.*, 2004); a classe das quimiocinas homeostáticas, cujas moléculas funcionam especificamente na migração de



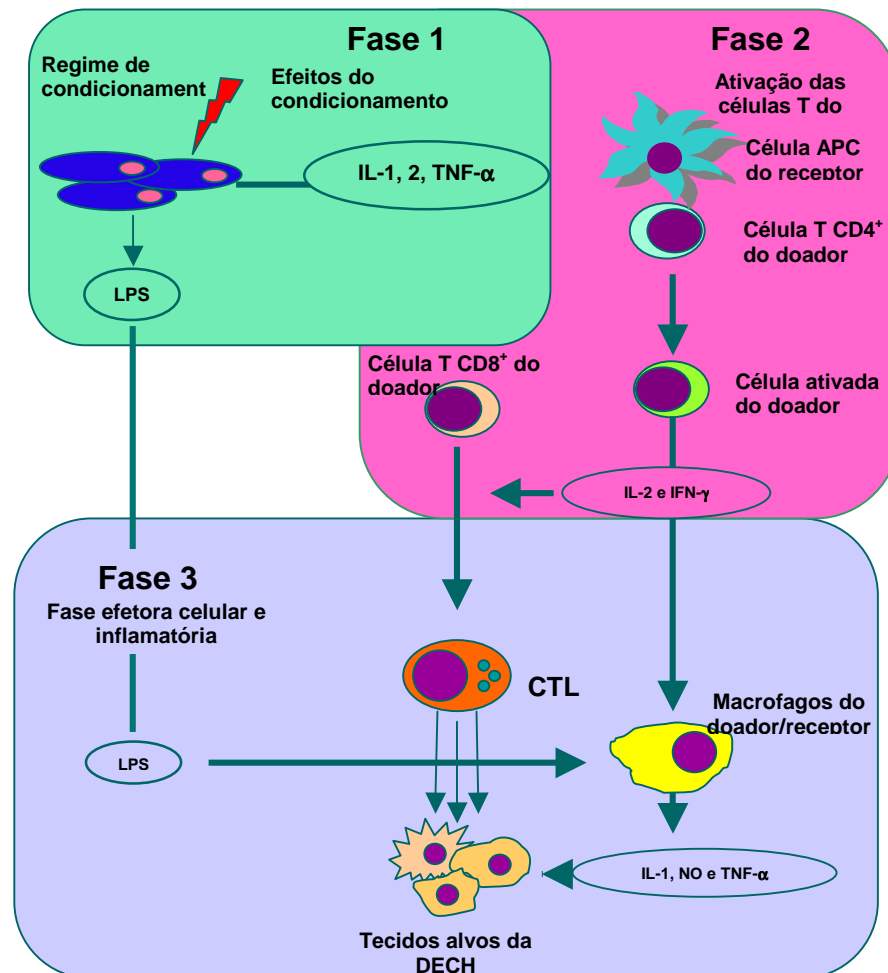
leucócitos para os tecidos linfóides, assim como na hematopoese; nesta classe estão as quimiocinas como a CCL19, CXCL12 e 13, que se ligam nos seus receptores específicos. Temos também a classe das quimiocinas inflamatórias, que inclui um grande número de moléculas envolvidas na migração das células da imunidade inata e adaptativa para os sítios de inflamação (Figura 4). Quimiocinas deste grupo são expressas em resposta a um estímulo inflamatório, incluindo produtos moleculares associados a patógenos e a citocinas inflamatórias tais como TNF $\alpha$  e IFNs (Moser *et al.*, 2004). Elas são expressas por células teciduais, fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas, monócitos, células NK e células T. Várias quimiocinas deste grupo estão envolvidas na recirculação de células T de memória restritas a tecidos específicos tais como o intestino delgado (CCL25/CCR9) (Papadakis *et al.*, 2003; Kunkel *et al.*, 2000) e a pele (CCL17, CCL22/CCR4) (Reiss *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 1999).



**Figura 4 – Quimiocinas inflamatórias e seus receptores.** Todos os leucócitos apresentam pelo menos um receptor de quimiocina na sua superfície celular, sendo que alguns receptores são encontrados em mais de um tipo de leucócitos. Legenda: B – célula B; D – célula dendrítica; E – eosinófilo; L – células de Langerhan; Ma – mastócitos; M $\phi$ - macrófago; N – neutrófilo; NK – célula *natural killer*; P – plaquetas; T1 – células T<sub>H1</sub>/T<sub>C1</sub>; T2 – células T<sub>H2</sub>/T<sub>C2</sub>. Adaptado de Wsocki *et al.*, 2005.

Ainda que as interações entre as células T e as células efectoras durante a DECHA seja um processo complexo de múltiplos passos, é considerado que a DECHA pode ser resumida em um processo de três fases com uma fase aferente e outra eferente (Antin & Ferrara, 1992; Ferrara *et al.*, 2003). Injúrias no epitélio e endotélio do hospedeiro geram sinais inflamatórios que recrutam células T do doador (Fase I). Neste meio inflamatório, as células T do doador reconhecem aloantígenos, resultando na ativação e

proliferação (fase II). As primeiras duas fases constituem a fase aferente da DECHA. Finalmente, as células T causam injúria adicional através de mecanismos específicos e não específicos durante a fase eferente (fase III). Este modelo de três fases está exemplificado na figura 5.



**Figura 5 – O modelo de três fases da DECHA.** Durante a fase 1, o regime de condicionamento (irradiação e/ou quimioterapia) leva a dano e ativação dos tecidos do hospedeiro e a indução da secreção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1). Aumento na expressão de antígenos HLA e moléculas de adesão levam ao aumento do reconhecimento do HLA do hospedeiro pelas células T maduras do doador. Durante a fase 2, células T do doador proliferam e secretam IL-2 e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas induzem ainda mais a expansão das células T, induzem as resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) e das células natural killer (NK), e mais importante, induzem os macrófagos a produzir TNF- $\alpha$  e IL-1. Ainda, óxido nítrico (NO) é produzido por esses macrófagos ativados, o que contribui para a injúria tissular durante a fase 3. Lipopolissacarídeo (LPS), que é liberado pela mucosa intestinal que foi danificada na fase 1, juntamente com o IFN- $\gamma$ , da fase 2, estimulam ainda mais os macrófagos a secretar citocinas e NO. Durante a fase 3, CTLs e NKs induzem a destruição dos tecidos alvos através da citotoxicidade mediada por células. Adaptado de Jaksch *et al.*, 2005.

Aplicando este modelo aos processos que ocorrem durante o TCTH, podemos dizer que o primeiro passo da DECHa ocorre durante a fase do condicionamento, uma fase que ocorre antes das células do doador serem infundidas no paciente. A terapia de condicionamento, que inclui quimioterapia e/ou radioterapia, é muito tóxica para os tecidos e leva ao dano e ativação (inflamação) dos tecidos dos pacientes, incluindo mucosa intestinal, fígado e outros tecidos. Os tecidos injuriados respondem com a produção de fatores, como quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão, que sinalizam ao sistema imune que a injúria ocorreu, resultando em uma resposta inflamatória (Ferrara, 1993).

Assim, quando as células do doador são infundidas no paciente cujos tecidos já foram danificados por diversos fatores, tais como a doença de base do paciente e seu tratamento prévio, infecções, e o regime de condicionamento constituído de altas doses de quimioterápicos administrados antes do TCTH, citocinas inflamatórias são secretadas pelas células ativadas do paciente, sendo as mais comuns TNF- $\alpha$  e IL-1 (Xun *et al.*, 1994). A presença de citocinas inflamatórias nesta fase aumenta a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e antígenos de HLA (Chang & Lee, 1986; Pober *et al.*, 1996). Estas moléculas levam a ativação das células dendríticas e reconhecimento do HLA do hospedeiro pelas células T maduras do doador (Matzinger, 2002). O TNF- $\alpha$  ainda contribui na injúria intestinal, afetando a integridade da mucosa intestinal diretamente. Isto resulta na liberação de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, que pode escapar através da mucosa danificada, e que sinaliza aos linfócitos e macrófagos presentes no intestino a produzir mais TNF- $\alpha$  e IL-1. A liberação de LPS e ativação dos linfócitos e macrófagos resultam na amplificação da injúria tecidual local e promovem a resposta inflamatória.

Apresentação dos antígenos do paciente às células T do doador, ativação das células T do doador e proliferação e diferenciação destas células T ativadas são os passos cruciais na segunda fase da DECHa. Após a infusão do enxerto, as células T contidas no enxerto reconhecem antígenos estranhos do hospedeiro apresentados pelas APCs. Quanto maior a disparidade entre os HLAs do doador e do paciente, maior será a resposta das células T.

A ligação do receptor de células T com o peptídeo apresentado pela molécula de HLA contida na superfície das APCs determinam a sinalização inicial para a estimulação das células T. Entretanto, um segundo sinal co-estimulatório é necessário

para a estimulação completa das células T. O resultado do primeiro sinal é regulado pelo segundo sinal. Três resultados podem ocorrer: ativação completa, ativação parcial ou anergia. Um crescente número de vias co-estimulatórias da célula T tem sido identificado (Denton *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 2001), porém as vias mais importantes parecem ser mediadas pelas interações entre CD28 com B7 e CD40 com seu ligante CD154.

A ativação e proliferação das células T é seguida pela secreção de citocinas e quimiocinas (Ho & Glimcher, 2002). A ativação envolve múltiplas vias, que acabam por ativar a transcrição dos genes para citocinas, como IL-2, IFN- $\gamma$  e seus receptores (Tseng & Dustin, 2002). IL-2 há muito tempo é considerada a primeira citocina envolvida na DECHa, tanto por seu papel central de ser um fator de crescimento de células T como pela ação da ciclosporina (CSA), que é conhecida por inibir a expressão a nível transcricional de IL-2 (Ringden, 1986). Sob a influência de IL-2 e outros mediadores imunes, as células T aloreativas se expandem e diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTL).

Já foi demonstrado que IFN- $\gamma$  está presente em níveis extremamente elevados em camundongos com DECHa (Hill *et al.*, 1997). Junto com IL-2, IFN- $\gamma$  induz tanto a expansão das células T, quanto as respostas das CTLs e NKs e ainda induz os macrófagos a produzirem IL-1 e TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$ , como outras citocinas inflamatórias, induz o aumento da expressão de quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas de HLA, que aumenta o recrutamento de células e de apresentação de antígenos. Outro efeito importante no contexto da DECHa é que o IFN- $\gamma$  induz diretamente o dano tecidual (Dicknson *et al.*, 1991; Mowat, 1989).

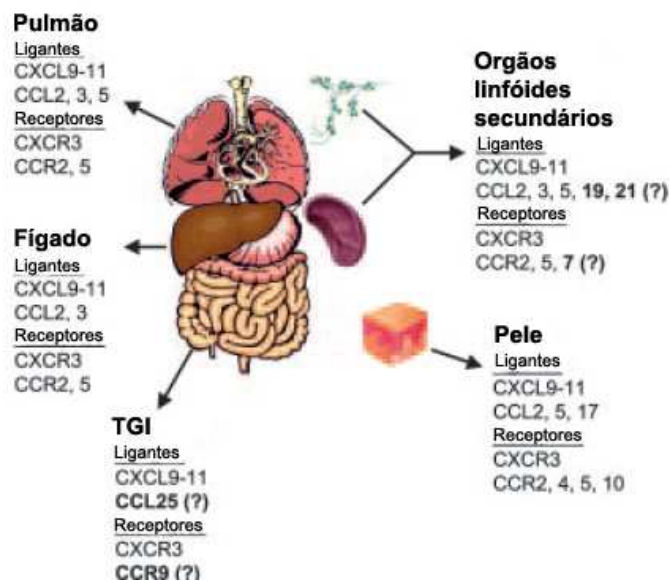
É amplamente conhecido que o sistema imune é por si só um alvo da DECH, e que imunossupressão é um fato comum de se observar em pacientes com DECHa. Em vários estudos, o IFN- $\gamma$  aparece como mediador desta forma de imunossupressão através da indução da expressão de NO e Fas (Klimpel *et al.*, 1990, Wall & Sheehan, 1994). Então, pelo aumento da apoptose mediada por Fas, IFN- $\gamma$  desempenha um importante papel na regulação da morte celular das células T ativadas do doador (Refaeli *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  também reduz a quantidade de LPS necessária para estimular macrófagos a produzir citocinas inflamatórias e NO. Sendo assim, o IFN- $\gamma$  tem duas funções opostas: em uma, intensifica a DECHa pela maturação das células dendríticas, levando a produção de citocinas inflamatórias e NO, e, por outro lado, diminui a

DECHa pela indução da expressão de receptores de Fas nas células T do doador, causando a sua morte celular induzida e diminuindo a resposta das células T do doador aos antígenos do hospedeiro (Yang *et al.*, 1998).

IL-18 é uma citocina descoberta recentemente que também influencia a patofisiologia da DECHa. Ela tem a capacidade de influenciar tanto as respostas Th1 quanto Th2. IL-18 é encontrada em níveis elevados na DECHa, porém o bloqueio de IL-18 acelera a mortalidade por DECHa em modelos animais (Reddy *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, foi mostrado que a administração de IL-18 logo após o TCTH aumenta os níveis de IFN- $\gamma$  no soro de pacientes, o que leva ao aumento da expressão de receptores de Fas nas células T CD4 do doador. Isto resulta na redução da DECHa mediada pelas células T CD4 pela indução de apoptose nestas células.

Quimiocinas inflamatórias são expressas nos tecidos inflamados pelas células infiltradas, como macrófagos ou monócitos, ou pelas células residentes, como as células epiteliais, endoteliais ou fibroblastos, devido ao estímulo pelas citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) ou por LPS. Este grupo de quimiocinas é especializado no recrutamento de células efetoras, incluindo monócitos, granulócitos e células T efetoras. Em estudos utilizando modelos de DECHa em camundongos foi demonstrado o papel crucial de várias quimiocinas e seus receptores (particularmente MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, Mig, MCP-1, MCP-3 e CCR5) em direcionar a infiltração de células T nos tecidos alvo durante a DECHa (Murai *et al.*, 1999; New *et al.*, 2002; Serody *et al.*, 2000). Linfócitos T que expressam CCR5 são recrutados para o fígado durante a DECHa em modelo animal (Murai *et al.*, 1999). Já Serody e colaboradores demonstraram que MIP-1 $\alpha$ , um ligante para CCR1 e CCR5, também está envolvido na DECH hepática (Serody *et al.*, 2000). MIP-1 $\alpha$  é crucial para o recrutamento de células T CD8 para o fígado, pulmão e baço durante a DECHa (Serody *et al.*, 2000). Duffner e colaboradores mostraram que a migração de células T CD8 de doadores para os órgãos alvo da DECH como o intestino depende da expressão de CXCR3 e que a presença deste receptor contribui significativamente para a destruição e a mortalidade que a DECH causa em camundongos (Duffner *et al.*, 2003). Células T que expressam CXCR-3 e CCR-5 causam DECHa no intestino e no fígado (Duffner *et al.*, 2003; Wytsocki *et al.*, 2004; Murai *et al.*, 1999). A figura 6 mostra um resumo das quimiocinas e seus receptores relacionados com os diferentes tecidos-alvo da DECHa já estudados em modelos animais.

Não se conhece o papel de várias quimiocinas e seus receptores na regulação da migração das células T do doador para os tecidos-alvo da DECH em pacientes. Entretanto, Jaksch e colaboradores mostraram que o aumento da expressão gênica de CCR5, CXCR3, CCR1 e CCR2 parece ter ligação com o aparecimento da DECHa após o TCTH (Jaksch *et al.*, 2005). Entretanto, quimiocinas e seus receptores podem atuar não somente como alvos potenciais para a modulação da DECHa, mas também como marcadores para o diagnóstico prévio da detecção da doença.



**Figura 6 – Quimiocinas e seus receptores nos órgãos alvo da DECHa.** Adaptado de Wysocki *et al.*, 2005.

Uma vez que as células T do doador estejam ativadas e proliferando, elas são direta ou indiretamente responsáveis pelo dano tecidual observada na DECH. Assim, tem início a fase três da DECHa. Três vias citolíticas são importantes na função efetora das células T e de outras células citolíticas: a via perforina/granzima B, a Fas/Fas ligante (FasL) e a injúria mediada diretamente pelas citocinas. Estudos com camundongos nocaute demonstraram um papel central de cada uma destas vias no estágio efetor da DECHa (Graubert *et al.*, 1997; Hattori *et al.*, 1998).

O receptor de Fas é um membro da família de receptores de TNF. É expresso em vários tecidos, incluindo nos órgãos-alvo da DECHa, e os níveis de expressão desta molécula aumentam na presença de citocinas pró-inflamatórias durante o processo inflamatório (Jaksch *et al.*, 2005; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). O seu ligante, FasL

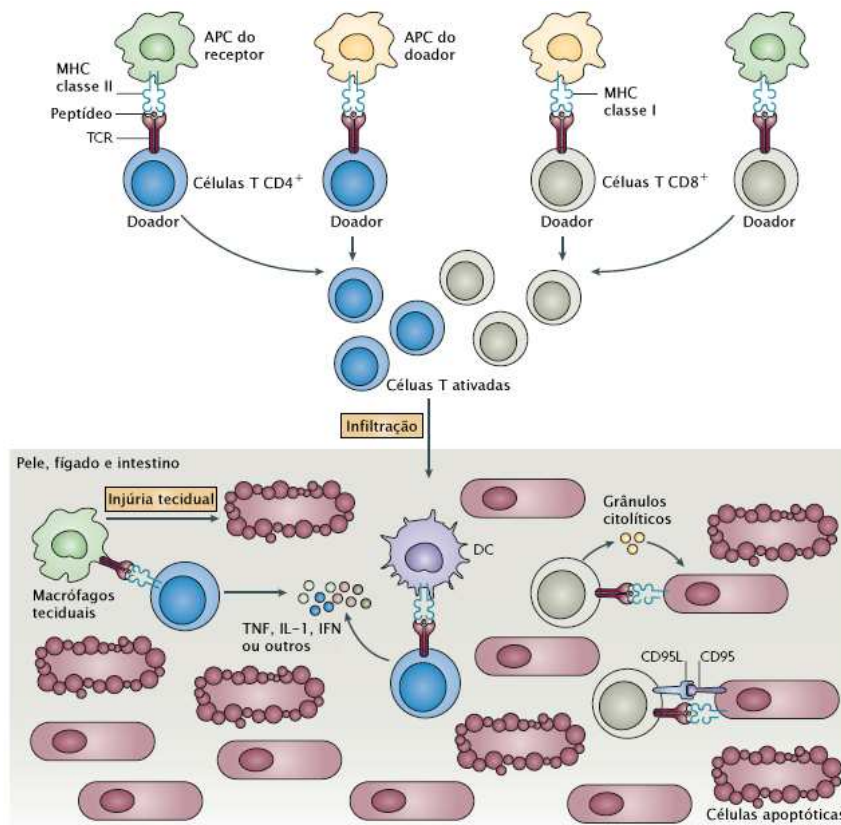
também pertence a família de TNF e é expresso predominantemente em células T ativadas, macrófagos e neutrófilos.

Já a perforina é expressa principalmente pelas CTL e células NK, e é estocada em grânulos citotóxicos juntamente com as granzimas e outras proteínas (Jaksch *et al.*, 2005; Shresta *et al.*, 1998). Na presença de cálcio, a perforina polimeriza e forma canais na membrana da célula-alvo, o que permite que a granzima entre nesta célula. Uma vez dentro da célula, a granzima ativa uma cascata de caspases, que levam a célula a apoptose (Jaksch *et al.*, 2005).

Na DECHa, vários estudos mostram que tanto a expressão de Fas quanto FasL está aumentada nas células T CD4 e CD8 proveniente dos doadores, e que os níveis séricos destas moléculas solúveis estão correlacionados com a severidade da doença (Jaksch *et al.*, 2005). Outros estudos, utilizando células T de doadores deficientes em perforina, injetadas em modelos de camundongo com disparidade entre MHC classe I e classe II mostraram um aumento da sobrevivência destes animais, indicando que a DECHa pode ser mediada através da via de perforina/granzima (Jaksch *et al.*, 2005; Graubert *et al.*, 1997).

Por outro lado, células T deficientes tanto para perforina quanto para FasL podem induzir a DECHa (Shlomchik, 2007). Isto sugere que outros mediadores atuam promovendo a apoptose celular, tais como TNF e outras citocinas. Isto tanto é verdade que um dos tratamentos para a DECHa é a administração de anticorpos anti-TNF, para bloquear a atividade de TNF.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória que ativa as células dendríticas e aumenta a apresentação de antígenos. Pela indução de quimiocinas inflamatórias, ela recruta células T efetoras, neutrófilos e monócitos para os órgãos-alvo. TNF- $\alpha$  causa, ainda, dano tissular diretamente pela indução de necrose das células-alvo, e ainda pode induzir destruição tecidual através de apoptose (Wall *et al.*, 1994). IL-1 é uma outra citocina inflamatória, secretada pelas células alorreativas, que tem a sua expressão aumentada em pacientes com DECHa (Jaksch *et al.*, 2005). O seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, porém estudos utilizando antagonistas de IL-1 em modelos de camundongos mostraram que houve uma diminuição da doença (Jaksch *et al.*, 2005; Hannum *et al.*, 1990). A figura 7 mostra os mecanismos de injúria na DECHa, exemplificando as interações entre os tipos celulares e moléculas secretadas.



**Figura 7 – Mecanismos de injúria pela infiltração tissular de células T aloreativas.**  
Adaptado de Shlomchik., 2007.

Apesar de vários estudos demonstrarem a participação de diversas citocinas e quimiocinas na fisiopatogenia da DECHA, a maioria destes estudos foram realizados em modelo animal. Recentemente, vários grupos têm se dedicado ao estudo destas moléculas em humanos, porém ainda não existe um consenso nos resultados obtidos. São resultados controversos e ainda não podem ser utilizados na clínica como uma forma de prever a doença. Um dos principais objetivos destes grupos tem sido a procura de biomarcadores que possam prever o risco de ocorrer a DECHA, antes mesmo dela se manifestar.

#### **4. Biomarcadores como auxiliar no diagnóstico da DECH aguda.**

Biomarcadores são considerados biologicamente mais informativos do que os métodos tradicionais e menos propensos a viés (Toniolo e Taioli, 1995). A heterogeneidade tanto da população de pacientes quanto dos diversos estágios patológicos da doença de base podem ser mais bem explicados por essas moléculas,



uma vez que elas por si só podem indicar um risco de manifestação de determinada doença (Liotta *et al.*, 2003)

O uso de biomarcadores pode ser a base para gerar um diagnóstico precoce e acurado da DECHa sem a necessidade de biópsias de órgãos. A procura de peptídeos ou proteínas envolvidas na DECHa neste momento é baseada na análise de moléculas conhecidas envolvidas na patofisiologia da doença. Um painel analítico de todas as proteínas e peptídeos presentes ou alterados após o TCTHs pode gerar conhecimentos significantes do desenvolvimento da DECHa.

No início destes estudos, a procura de biomarcadores se restringiu a análises de plasma e pele destes pacientes. Numerosos trabalhos procurando alterações de moléculas envolvidas com a DECHa foram realizados, utilizando as mais variadas metodologias. Remberger e colaboradores mostraram que os níveis de citocinas no soro de pacientes com DECHa não podem ser correlacionadas com o quimerismo com o doador, uma vez que estas citocinas encontram-se aumentadas já no pré transplante, tanto no grupo com quimerismo total quanto no grupo com quimerismo misto (Remberger *et al.*, 2003). Jaksch e colaboradores, em 2005, observaram um aumento na expressão dos genes dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, e este aumento estava relacionado com o desenvolvimento da DECHa (Jaksch *et al.*, 2005). Fujji e colaboradores observaram o aumento de IL-5, IL-6 e IL-10 no soro de pacientes com DECHa (Fujji *et al.*, 2006). Piper e colaboradores, em um estudo um pouco maior que os anteriores, verificaram que existe um papel importante de CXCL10 e CXCR3 na patogenia da DECHa, uma vez que o ligante foi encontrado em altas concentrações no plasma e o receptor teve um aumento de expressão em células mononucleares (Piper *et al.*, 2007). Neste mesmo trabalho, eles mostraram que essa interação está diretamente relacionada com o recrutamento de células T regulatórias para o sítio da doença.

Outras abordagens de procura de biomarcadores vêm sendo utilizadas mais recentemente. A abordagem proteômica permite analisar o perfil protéico total da amostra utilizada, e pode gerar várias candidatas à molécula biomarcadora, sem ter ido à procura de uma molécula específica.

Um estudo iniciado em 2004 tentou identificar possíveis perfis protéicos que pudessem estar relacionados com a DECHa, comparando a urina de pacientes submetidos ao TCTH com e sem DECH (Kaiser *et al.*, 2004; Weissinger *et al.*, 2007). Eles identificaram fragmentos de colágeno  $\alpha$ -1 na urina de pacientes com DECHa.

Srinivasan e colaboradores observaram perfis protéicos diferentes no plasma de pacientes com DECHa, quando este perfil foi comparado com o perfil protéico do plasma destes mesmos pacientes no pré transplante, porém não identificaram nenhuma proteína específica (Srinivasan *et al.*, 2006).

Em 2009, Paczesny e colaboradores identificaram um painel de biomarcadores no plasma de pacientes com DECHa (Paczesny *et al.*, 2009). Neste trabalho, eles determinaram um painel de quatro proteínas (receptor de IL-2, receptor de TNF, IL-8 e HGF) que podem ser encontradas em 85% dos pacientes que não tiveram maiores complicações no pós transplante. Para chegar a estas quatro proteínas, eles utilizaram a metodologia de microarranjos de anticorpos para 120 proteínas inflamatórias.

Em um trabalho posterior, este mesmo grupo encontrou um biomarcador para a DECHa de pele, a elafina, um inibidor de proteinase epidermal induzida por TNF- $\alpha$  (Paczesny *et al.*, 2009). Neste caso eles utilizaram um *pool* de plasma de 10 pacientes com DECHa de pele e compararam com 10 que não desenvolveram DECHa e observaram que nos pacientes com DECH de pele, a concentração desta proteína estava 2x aumentada no plasma em relação aos pacientes que não desenvolveram a doença. Neste caso, eles utilizaram a metodologia proteômica MS/MS.

Uma vez que a doença do enxerto-contrá-hospedeiro aguda é uma das maiores causas de morbidade nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea, fica evidente a importância do estudo desta doença por uma unidade de transplante. Ainda temos que levar em consideração que existe pouco conhecimento da base molecular da doença em humanos, uma vez que a maioria dos estudos foi desenvolvido em modelos animais.

Devido a grande controvérsia encontrada na literatura, um estudo mais abrangente e com um número maior de pacientes fez-se necessário diante da necessidade de se conhecer a doença em humanos. Sendo assim, neste trabalho nós propusemos o acompanhamento de 100 pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoéticas durante 1 ano, a fim de tentar identificar possíveis marcadores da DECHa.

## *OBJETIVOS*

**OBJETIVO PRINCIPAL DA TESE**

Estudar as modificações moleculares e celulares que ocorrem nos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas, correlacionando com o aparecimento da doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda.

***Objetivos específicos:***

Acompanhar os pacientes no pós-TCTHs, a fim de:

- ❖ Analisar a interferência das diversas variáveis clínicas-biológicas no risco do paciente desenvolver DECHa.
- ❖ Analisar o teor de algumas citocinas no plasma e pele destes pacientes em dias pré-determinados, correlacionando a alteração do nível destas moléculas com o aparecimento da DECH aguda.
- ❖ Analisar o teor de algumas quimiocinas no plasma e pele destes pacientes, em dias pré-determinados, correlacionando a alteração do nível destas moléculas com o aparecimento da DECH aguda.
- ❖ Analisar o perfil das populações celulares no sangue periférico dos pacientes no pós-TCTHs e verificar alterações que se correlacionem com o aparecimento da DECHa.
- ❖ Determinar o perfil proteômico das células mononucleares dos pacientes com DECHa e compará-los com o perfil proteômico das células mononucleares de doadores saudáveis, de modo a identificar novos possíveis biomarcadores de desenvolvimento da DECH.

## *METODOLOGIA*

***1 – Definição de critérios de inclusão:***

Todos os pacientes submetidos ao transplante alogênico que receberam células-tronco originadas de medula óssea (MO), sangue periférico mobilizado (SPM) ou sangue de cordão umbilical (SCUP), aparentado ou não aparentado, conforme descritos no Anexo 1. Foram excluídos pacientes que foram submetidos à transplante autólogo e pacientes abaixo de 5 anos de idade. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), conforme carta apresentada no Anexo 2.

***2 – Pacientes e amostras:***

Neste trabalho foram analisados 100 pacientes com idade entre 5 e 60 anos de idade (67 homens e 33 mulheres) (Anexo 1). Todos foram informados do estudo e aceitaram participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de biópsias de pele (Anexo 3) e para a coleta de sangue (Anexo 4). Esses pacientes foram submetidos ao transplante alogeneico de MO, SPM e SCUP, para tratamento de doenças de base malignas e não malignas. Eles sofreram regimes de condicionamento mieloablativo ou de intensidade reduzida, e foram acompanhados desde o dia -8 pré-transplante até o dia +360 pós-transplante.

***3 – Obtenção dos dados clínicos-biológicos dos pacientes.***

Para a obtenção dos dados clínicos foi realizado intenso estudo prospectivo dos prontuários médicos de cada paciente, onde pudemos obter todas as variáveis clínicas-biológicas necessárias para este estudo. As informações coletadas foram a doença de base, o tipo de transplante, idade, sexo, fonte de células utilizada para o transplante, HLA do paciente e doador, regime de condicionamento, regime de profilaxia da DECHa, dia de acometimento da DECHa, órgão acometido pela DECHa, estadiamento da DECHa, dia do óbito e causa do óbito. Essas análises foram coletadas mensalmente de cada paciente, e os dados obtidos podem ser visualizados na tabela A1 do anexo 3.

***4 – Coleta de biópsia de pele:***

As biópsias de pele foram coletadas nos dias D-8, D0, D+14, D+28 e D+100 e, além destes dias, quando o paciente foi diagnosticado com DECH, foi coletada uma nova biópsia no local da lesão, no dia. As biópsias foram encaminhadas para a Divisão de Patologia do INCA (DIPAT) para confirmação ou não da DECH. Além do

diagnóstico da DECH, cortes de biópsias foram analisados para algumas citocinas, e algumas quimiocinas e seus receptores.

### ***5 – Análise patológica:***

Para visualização histológica, as biópsias de pele foram fixadas, desidratadas por decrescentes concentrações de etanol, clarificadas por xilol, e incluídas em parafina. Em seguida, o material parafinado foi cortado em micrótomo na espessura de 4 µm e os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina-eosina. O diagnóstico da DECH aguda foi realizada por microscopia ótica convencional, por uma dermatopatologista especialmente engajada neste projeto.

### ***6 – Coleta de sangue periférico:***

A coleta de sangue dos pacientes submetidos ao transplante foram realizadas nos dias D-8, D0, D+14, D+28, D+45, D+100, D+180 e D+360 e, além destes dias, quando o paciente foi diagnosticado com DECH, foi coletada outra amostra de sangue no mesmo dia. Uma alíquota deste sangue (1 ml) foi separada para o experimento de determinação das populações celulares e o restante do sangue foi processado para a separação das células mononucleares e plasma. O plasma foi congelado para análise posterior de citocinas e quimiocinas. Das células mononucleares foram extraídas proteínas totais para a análise proteômica.

### ***7 - Preparação das amostras para dosagem de citocinas e quimiocinas e para a obtenção dos extratos protéicos totais:***

#### ***7.1. Preparação dos extratos totais de proteínas:***

O sangue coletado de cada paciente nos diferentes dias foi utilizado para a obtenção das células mononucleares. As amostras foram submetidas a uma centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma), na proporção 1:1. O plasma separado desta centrifugação foi separado e congelado para a análise de citocinas e quimiocinas. O anel celular formado pela centrifugação foi separado, centrifugado e o concentrado de células foi lavado duas vezes com 1 ml de solução de Lise de Hemácias (10mM Tris pH8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl). Depois disso, a amostra foi submetida a nova centrifugação e seu sobrenadante descartado. O concentrado de células após a lavagem com a solução de lise de Hemácias foi ressuspenso em 200µL de Tampão de Extração

de Proteínas totais (50mM de Tris pH7.5, 5mM EDTA, 10mM EGTA, 50mM NAF 20mM  $\beta$ -Glicerofosfato, 250mM NaCl, 0.1% de Triton X-100) acrescidos de inibidores de proteases (240  $\mu$ g/mL AEBSF; 10 $\mu$ g/mL Bestatina; 10 $\mu$ g/mL Pepstatina; 10 $\mu$ g/mL Leupeptina; 18 $\mu$ g/mL E-64), na proporção 1:100 de tampão de extração, incubadas durante trinta minutos a 4°C e depois centrifugadas a 12.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, novamente centrifugado por 2 minutos, sendo que o sobrenadante desta última centrifugação foi considerado o extrato de proteínas totais. Os extratos foram quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Após quantificação, os extratos protéicos foram armazenados em alíquotas de 200 $\mu$ L a -70°C.

## **7.2. Preparação das amostras para dosagem de citocinas e quimiocinas:**

Para a dosagem da quantidade de citocinas e quimiocinas no plasma dos pacientes nos dias relacionados. Utilizamos o KIT CBA de citocinas humanas Th1/Th2 (Becton e Dickson), que analisa a quantidade das seguintes citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-8. Para a análise de quimiocinas, foi utilizado o KIT CBA de quimiocinas humanas, que analisa as quimiocinas IL-8 (CXCL-8), RANTES (CCL5), MIG (CXCL9), MCP-1 (CCL2) e IP-10 (CXCL10) (Becton e Dickson). Para os dois kits, foi utilizado o mesmo protocolo a seguir.

O plasma separado da centrifugação por Ficoll-Hypaque descrito no item anterior foi armazenado à -20°C para posterior análise. Uma alíquota de 200  $\mu$ l de cada amostra foi separada e centrifugada. De forma a obtermos a curva padrão de citocinas e quimiocinas, reconstituímos os padrões de existentes nos kits CBAs e fizemos as diluições seriadas destes padrões. Em seguida, de acordo com o protocolo do kit, acrescentamos 30  $\mu$ l da mistura de *beads* nas amostras e nos padrões, 30  $\mu$ l de anticorpo PE nas amostras e nos padrões e deixamos incubando por 3 horas a temperatura ambiente. Depois da incubação, lavamos com PBS e centrifugamos por 7 minutos a 400 g. Retiramos parte do sobrenadante e o concentrado foi ressuspensão e adquirido por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados por software específico (BD CBA 6 beads analyses – BD biosciences).



### **8 – Análise das populações celulares no sangue periférico:**

Parte do sangue coletado de cada paciente também foi utilizada para avaliar as populações celulares presente naquele determinado momento. Para estas quantificações, utilizamos anticorpos específicos para linfócitos T (CD3<sup>+</sup> PerCP), linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup> FITC), linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup> PE), células NK (CD56<sup>+</sup> PE), células T regulatórias (CD4<sup>+</sup> FITC e CD25<sup>+</sup> PE), linfócitos B (CD19<sup>+</sup> PE-Cy5) e um marcador pan-leucocitário (CD45<sup>+</sup> FITC) todos da BD biosciences. Foram montados os seguintes painéis: tubo 1 – controle, sem anticorpo; tubo 2 – CD4/CD8/CD3; tubo 3 – CD45/CD56/CD19; tubo 4 – CD4/CD25. Foi adicionado 5µl de cada anticorpo aos tubos correspondentes, cada um contendo 1 milhão de células mononucleares. Estas células foram incubadas com os anticorpos por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, foram adicionados 2 ml de solução de lise de hemácia (Tampão FACS LISING) e, depois de agitado, os tubos foram incubados por 10 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados à 400 g por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e o concentrado ressuspense com 1 ml de tampão PBS 1x + 10% de BSA. Após 5 minutos de incubação, o material foi centrifugado novamente e o sobrenadante foi desprezado, e o concentrado foi ressuspense com um Tampão PBS 1x + 1% de formaldeído. Depois disso, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACScan – BD), onde adquirimos 50.000 eventos.

### **9 – Imunohistoquímica**

As biópsias que foram confirmadas com diagnóstico positivo para DECH aguda e seus controles em área não afetada da pele foram analisadas por imunohistoquímica com anticorpos específicos e com o kit ABC Elite mouse IgG (Vector Lab). Este kit usa o método de reconhecimento por conjugação de biotina com streptavidina, e usamos a revelação por DAB e contra-coloração por hematoxilina.

Em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina foram aplicados cortes histológicos de 4µm de espessura. Após a completa aderência do corte à lâmina, este foi aquecido a 60°C em estufa seca e desparafinado com lavagens sucessivas de xilol, re-hidratado com banhos sucessivos com etanol (100%, 95%, 90%, 80% e 70%) e H<sub>2</sub>O destilada. Após a re-hidratação dos cortes, estes foram bloqueados para peroxidase endógena com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min, lavados com PBS 1X por 5 min, incubados com soro fetal bovino 5% por 5 min para bloqueio de ligações inespecíficas e incubadas com

o anticorpo primário por pelo menos 12h em câmara úmida a 4°C. Após esta incubação os cortes foram lavados com PBS 1X por 2 vezes 5min cada, incubada com anticorpo secundário biotilado por 1h, e lavados novamente por 3 vezes, incubando por 20 min cada vez. Aproximadamente 30 min antes de acabarem as lavagens com PBS foi preparada a solução AB do kit (que contém streptavidina). Após o término das lavagens, os cortes foram incubados com a solução AB por 30 min, lavados com PBS 1X e revelados com DAB. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina por 10s, lavados em água corrente e desidratados em lavagens seriadas de etanol (70%, 80% 90%, 100% 2x) e 2 lavagens com xilol. Após a desidratação as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e lamínula para análise em microscópio ótico. No controle negativo não foi utilizado o anticorpo primário.

Os anticorpos para este estudo foram escolhidos de acordo com dados da literatura, onde verificamos as principais citocinas, quimiocinas e seus receptores expressos na pele. São eles: TNF- $\alpha$  (clone MAB11 – BD Pharmigen), IFN- $\gamma$  (clone 4S.B3 – BD Pharmigen), IP-10 (clone 6D4/D6/G2 – BD Pharmigen) e CXCR3 (clone 1C6/CXCR3 – BD Pharmigen). As diluições dos respectivos anticorpos foram: TNF- $\alpha$  - 1:1000, IFN- $\gamma$  - 1:2000, IP-10 – 1:4000 e CXCR3 – 1:4000.

## ***10 – Análise proteômica***

### ***10.1. Precipitação do Extrato Protéico.***

Para as análises em gel bidimensional, as quantidades de 300 $\mu$ g de cada amostra de extrato protéico total foram precipitadas com o kit 2-D Clean up (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. O kit 2-D Clean up permite a retirada de impurezas, tais como ácidos nucleicos, lipídeos, excesso de sal (geralmente oriundo do tampão de extração de proteínas), aprimorando a isoeletrofocalização das proteínas.

Os precipitados secos a temperatura ambiente por, no máximo, 5 minutos foram imediatamente ressuspensos em 200 $\mu$ L de tampão de rehidratação (TR) (6M Uréia; 2M Thiouréia; 2% w/v ASB-14; 15mM DTT; 0,002% w/v Azul de Bromofenol 1%). Ao TR, utilizado para amostras corridas no IPGphor III (GE Healthcare), foi acrescido 0,5% v/v de IPG Buffer 3-10 (Amersham Biosciences).

## **10.2. Análise Proteômica.**

Uma das mais importantes ferramentas de análise proteômica é a combinação do gel bidimensional e a espectrometria de massa. O gel bidimensional é realizado em duas fases: a primeira consiste na separação das proteínas por ponto isoelétrico (isoeletrofocalização) e a segunda fase consiste na separação dessas proteínas por peso molecular. Porém, antes de ocorrer a primeira fase, as tiras necessitam de um processo chamado de reidratação.

- **Rehidratação**

A rehidratação foi realizada no sistema IPGphor III (GE Healthcare), e se deu sob voltagem de 40V por 14 horas. Foram utilizadas tiras de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip) com faixa de pH 4-7 e 11 cm de comprimento (GE Healthcare).

- **Isoeletrofocalização (1D)**

A isoeletrofocalização (IEF) foi realizada em tiras de gel de acrilamida com gradiente de pH fixo (IPG), permitindo a produção de géis com alto índice de definição do pH. Após a rehidratação, as tiras foram submetidas à IEF, que consiste na separação das proteínas segundo seu ponto isoelétrico (na qual a carga de cada proteína é igual a zero). As amostras foram focalizadas no sistema IPGphor III (GE) por 30.651 Vh.

- **Segunda Dimensão (2-D)**

Após a isoeletrofocalização das proteínas, as tiras de poliacrilamida foram equilibradas em duas etapas em 10 mL de solução de equilíbrio por 15 minutos (1,5M Tris-HCl pH 8,8; 6M Uréia; 30% Glicerol; 2% w/v SDS; 0,002% Azul de Bromofenol 1% w/v). Na primeira etapa foi adicionado 10 mg/mL de DTT (USB) à solução de equilíbrio e na segunda etapa foi adicionada à solução de equilíbrio 25 mg/mL de iodocetomida (Sigma). As proteínas separadas na primeira dimensão foram submetidas, posteriormente, a eletroforese em gel SDS-PAGE 8-18% (GE Healthcare) no sistema Multiphor II de acordo com o programa sugerido pelo manual do fabricante (Berkelman & Stenstedt, 1998). O padrão de peso molecular utilizado foi o Bench Mark protein ladder (Invitrogen). Os géis 2-D foram corados com Coomassie Blue coloidal (Neuhoff *et al.*, 1985) por 72 horas, descorado com água destilada e mantidos em ácido acético 1% até sua digitalização.

### **10.3. Análise dos Padrões Proteômicos.**

Após a eletroforese bidimensional, os géis foram digitalizados no scanner Image Scanner (GE Healthcare), utilizando-se o programa Image Master LabScan™ v 5.0 (com resolução de 300 dpi). As análises dos padrões protéicos foram feitas visualmente e também pelo programa Image Master 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare), conforme recomendações do manual.

### **10.4. Processamento e preparação das amostras para análise por espectrometria de massas.**

Todos os *spots* foram retirados dos géis com auxílio de bisturi, e colocados em tubos eppendorf siliconizados (Protein LoBind tube 1,5mL, Eppendorf AG). Cada *spot* retirado foi lavado com 400µL de solução 50% bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50 mM pH 7,8 e 50% acetonitrila (ACN) 100%, agitada por 10 segundos, e sonicada por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Para desidratar o gel, 200µL de ACN 100% foi adicionada em cada tubo eppendorf, e incubado por 10 minutos. Após a mudança de aspecto dos géis de transparente para branco, a solução de ACN foi descartada e as amostras foram armazenadas a -70°C até a digestão enzimática. A digestão das proteínas foi feita por hidrólise triptica (enzima Seq. Grade Modified Trypsin - Promega) em gel. A tripsina (20µg) foi diluída em 2mL de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 25mM pH 7,8. Colocou-se em cada tubo, 10µL da solução de 10µg/µL da tripsina. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante a noite, para a extração de peptídeos.

O procedimento de extração dos peptídeos, a seguir, foi realizada por duas vezes: foram aplicados 10µL de solução de extração (50% ACN e 5% ácido trifluoroacético - TFA), as amostras foram sonicadas por 5 minutos e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao final, as amostras foram guardadas a -70°C até a sua análise.

### **10.5. Espectrometria de Massa.**

Para a análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems), 0,5µL de cada amostra de peptídeos foi homogenizada em 0,5µL de matriz de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxicinamico (CHCA) que se encontrava 10mg/mL em solução 50% ACN e 5% de TFA. As amostras foram aplicadas na placa do aparelho, juntamente com os calibrantes do kit Sequazyme™ Peptide Mass

Standards (Applied Biosystems). Os espectros obtidos foram analisados e as proteínas foram identificadas por bancos de dados, como a seguir.

#### **10.6. *Análise e identificação em Bancos de Dados.***

As amostras analisadas por MS/MS foram identificadas por buscas no Banco de Dados Humano IPI (International Protein Index) através do programa MASCOT Daemon v2.1 (Perkins *et al.*, 1999) (Matrix Science), instalado localmente. No programa MASCOT Daemon, os seguintes parâmetros foram utilizados para a busca:

- tolerância de 0,2 Da para MS;
- tolerância de 0,2 Da para MS/MS;
- modificações variáveis: oxidação da metionina (passível de ocorrer durante a segunda dimensão);
- modificações fixas: carbamidometilação da cisteína (devido a alquilação das cisteínas pela iodoacetoamida durante a etapa de equilíbrio das tiras isoeletrofocalizadas);
- Máximo de 1 sítio tríptico de corte não clivado.

#### **10.7. *Análise in silico das proteínas.***

As proteínas identificadas tiveram informações como domínios, localização celular, funções, entre outros, inferidas utilizando-se as seguintes ferramentas de bioinformática:

- banco de dados - Swiss Protein e National Center for Biotechnology Information (NCBI);
- busca por seqüências homólogas – Basic Local Alignment Search Tool (BLAST);
- busca por interações proteicas – Human Interactome Map (HiMap).

### **11 – *Análise estatística.***

Para a análise das variáveis clínicas, os pacientes foram divididos em dois grupos: com e sem DECHa. Estadiamento clínico da DECHa em graus igual ou maior que I, confirmado por avaliações clínicas, histopatológicas e/ou exames hematológicos foram considerados DECHa. Para a análise univariada, o Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram usados para analisar a associação entre DECHa e as variáveis categóricas. Para a análise multivariada, regressão logística foi realizada para encontrar uma

associação entre DECHa (variável dependente) e as diferentes variáveis clínicas-biológicas (variáveis independentes). O ExpB encontrado foi definido como o odds ratio (OR) das variáveis independentes com a dependente. As curvas de sobrevida foram construídas usando o método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log rank.

Para a análise das citocinas, quimiocinas e populações celulares, a seleção do melhor ponto de corte para níveis destes marcadores como fator de risco para a ocorrência de DECHa foi determinada pela construção da curva ROC, com estimativas de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Para todas as moléculas e células estudadas, o ponto de corte foi a mediana de cada alvo de estudo no D-8. Assim, categorizamos cada uma destas variáveis no D+14, D+28 e D+45 como estando abaixo ou acima do ponto de corte. Para a análise univariada, qui-quadrado e teste exato de Fisher foram usados para analisar a associação entre a ocorrência de DECHa e as citocinas, quimiocinas e população celulares. Para a análise multivariada, a regressão logística foi realizada para determinar a associação entre DECHa, as moléculas e células de estudo e as variáveis clínicas. Todas as estatísticas foram realizadas com o software SPSS 17.0 for Windows ® (SPSS Inc.) e o valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## *RESULTADOS*

Neste estudo pretendemos avaliar as alterações celulares e moleculares que ocorrem nos pacientes submetidos ao TCTH, em uma tentativa de identificar biomarcadores da DECHa. Neste sentido, é importante iniciar esta análise verificando quais parâmetros clínicos-biológicos poderiam estar influenciando no estabelecimento da doença.

## ***1 – Análise dos dados clínicos e biológicos dos pacientes e identificação de características que se relacionem a DECHa.***

### ***1.1. Características dos pacientes***

A tabela II resume as características clínicas-biológicas básicas dos pacientes incluídos neste estudo. Um total de cem pacientes, de cento e quarenta e oito pacientes consecutivos submetidos ao TCTH alogênico no período entre Dezembro de 2005 até Março de 2009, foram elegíveis para este estudo (67,56%).

Dos 100 pacientes submetidos ao TCTH, vinte e três tinham como doença de base leucemia linfoblástica aguda (LLA), dezenove leucemia mielóide aguda (LMA), doze anemia aplástica severa (AAS), onze leucemia mielóide crônica (LMC), nove Doença de Hodgkin (DH), oito síndrome mielodisplásica (SMD), oito Linfoma não Hodgkin (LNH), três Mieloma Múltiplo (MM), três hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), dois Anemia de Fanconi (AF) e um leucemia bifenotípica aguda (LBA). A média de idade foi de 27 anos (variação 5-60) e a relação entre sexo masculino e feminino foi de 2,03 (n = 67 e 33, respectivamente).

Vinte e oito pacientes receberam condicionamento de intensidade reduzida e setenta e dois pacientes receberam condicionamento mieloablativo. Oitenta e um pacientes receberam células-tronco a partir de doadores relacionados (parentes), enquanto dezenove pacientes receberam células-tronco a partir de doadores não relacionados. Sessenta e dois pacientes receberam células-tronco obtidas a partir da medula óssea, trinta pacientes receberam de células obtidas do sangue periférico e oito pacientes receberam células obtidas de sangue do cordão umbilical. Doze pacientes tinham pelo menos 1 incompatibilidade de HLA (12%).



**Tabela II – Características dos pacientes e seu transplante**

<i>n=100</i>	Mieloablativo (n=72)	Intensidade reduzida (n=28)
Idade (anos) (media, faixa)	25,85 (5-53)	28,86 (8-60)
Sexo		
Masculino	47	20
Feminino	25	8
Diagnostico		
LLA	23	-
LMA	19	-
LMC	11	-
AAS	4	9
DH	3	6
SMD	7	1
LNH	1	7
MM	-	3
HPN	2	1
AF	1	1
LBA	1	-
Classificação dos grupos		
Doenças não malignas (DNM)	7	11
Doenças malignas precoces (DMP)	30	-
Doenças malignas avançadas (DMA)	31	2
Linfomas e mielomas (LM)	4	15
Fonte de células tronco		
Medula óssea (BM)	50	12
Sangue periférico mobilizado (SPM)	14	16
Sangue de cordão umbilical (SCUP)	8	-
Doador aparentado		
Sim	54	27
Não	18	1
Match HLA		
Completo	61	27
Incompleto	11	1
Profilaxia DECH		
CSA+MTX	61	26
CSA	7	1
CSA+MMF	3	-
MTX	-	1
MTX+FK	1	-
Ocorrencia de DECH		
Sim	41	14
Não	31	14
Média dos dias que ocorreu DECHa (dia, faixa)	39,27 (13-180)	73,57 (14-150)
Estadiamento da DECH aguda		
I - II	26	9
III - IV	15	4
Óbito		
Sim	28	10
Não	44	18

**Legenda:** LLA - leucemia linfóide aguda, LMA - leucemia mielóide aguda, AAS - anemia aplástica severa, LMC - Leucemia mielóide crônica, DH - Doença de Hodgkin, SMD - Síndrome mielodisplásica, LNH – Linfoma Não Hodgkin, MM - mieloma múltiplo, HPN - Paroxística Hemoglobínúria noturna, AF - Anemia de Fanconi, LBA - leucemia bifenotípica aguda, CSA - ciclosporina, MTX - metotrexato, MMF - micofenolato mofetil, FK - tacrolimus.

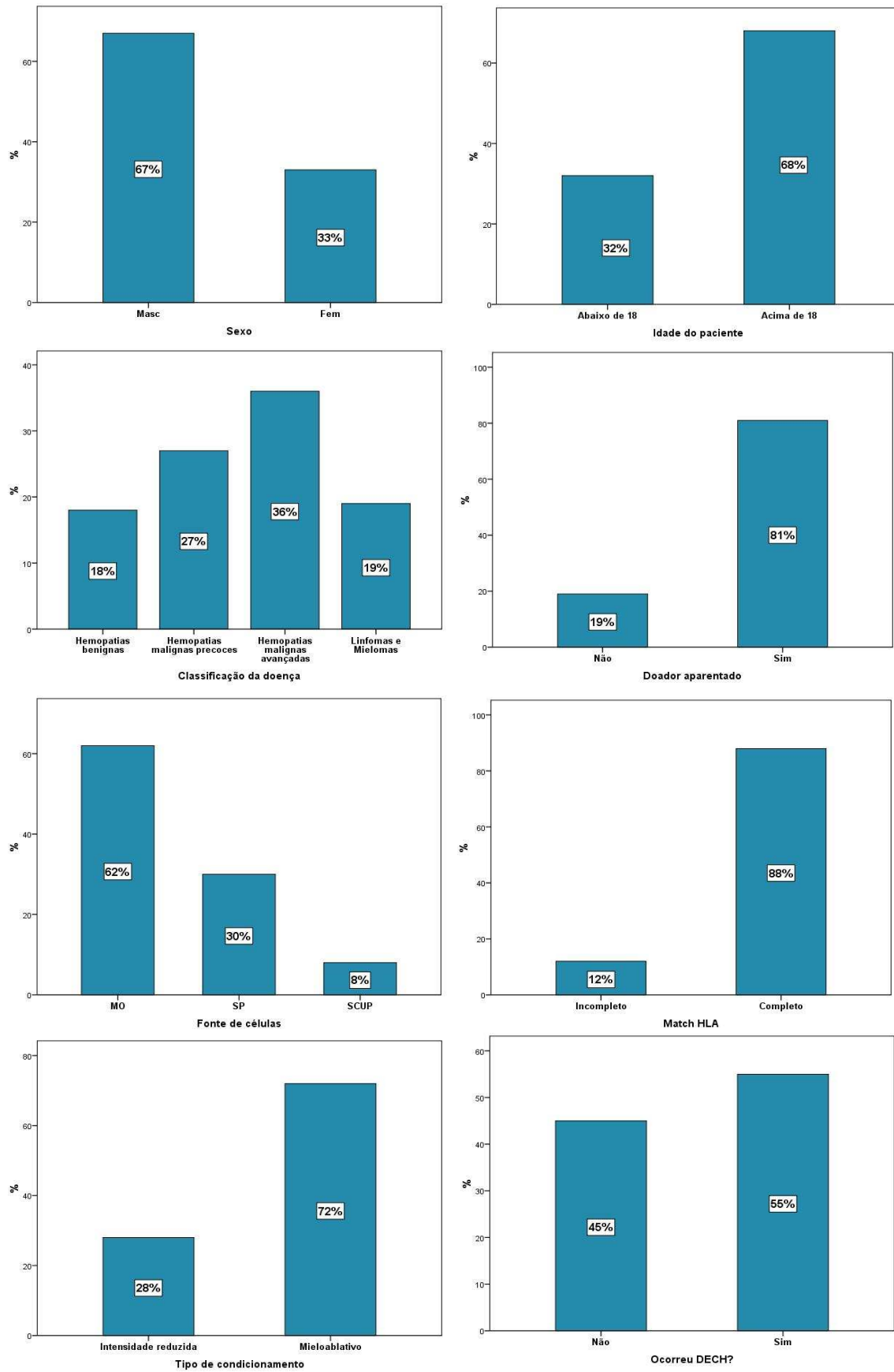
A profilaxia mais comum para a DECH aguda foi uma combinação de ciclosporina (CSA) e metotrexate (MTX) (n = 87). Apenas CSA foi utilizada em oito pacientes, três pacientes utilizaram uma combinação de CSA e micofenolato mofetil (MMF), um paciente utilizou apenas MTX e um paciente utilizou uma combinação de MTX e tacrolimus (FK506). Destes pacientes, cinquenta e cinco desenvolveram DECH aguda. Trinta e oito pacientes faleceram de várias complicações (doença recidiva ou progressão da doença na ausência de rejeição, n = 8; DECH aguda, n = 6; infecções, n = 16; e toxicidade relacionada ao tratamento, n = 7, causa desconhecida, n=1). A figura 8 mostra, em gráficos, as porcentagens dentro de cada variável clínica.

### **1.2. Desenvolvimento da DECH:**

Dos 100 pacientes incluídos neste estudo, 55 desenvolveram DECH aguda em qualquer grau (55%), conforme estabelecido por Przepiorka e colaboradores (1995). Desses 55 pacientes, 65,5% desenvolveram DECH aguda graus I-II e 34,5% desenvolveram DECHa graus III-IV. A média de dias para a ocorrência de DECH foi de 45 dias (13-180 dias).

Em uma análise univariada, analisamos a ocorrência de DECHa de acordo com a classificação da doença, fonte de células, regime de condicionamento, compatibilidade HLA, idade, sexo e parentesco do doador (Tabela II). Existe uma relação entre a ocorrência de DECHa e o parentesco do doador (Chance de risco [OR] de 1,91, 95% intervalo de confiança [CI 95%] 0,96 - 3,79, p = 0,038), e uma forte relação entre a ocorrência de DECHa e compatibilidade do HLA (OR de 3,61, CI 95% 1,00 - 12,95, p = 0,005), enquanto que para os outros fatores não foi encontrada qualquer relação estatisticamente significativa (Tabela III). Curiosamente, no grupo HLA match incompleto, apenas 2 dos 12 pacientes (16,67%) desenvolveram DECHa, enquanto que no grupo HLA match completo, 53 dos 88 pacientes (60,23%) desenvolveram DECHa (Figura 9). Como este resultado apresenta alguma controvérsia com os dados da literatura, investigamos ainda que pacientes desenvolveram a doença.

No grupo HLA match incompleto, os 2 pacientes que desenvolveram DECHa foram classificadas no grupo de doenças malignas avançadas - DMA (1 com LMC em crise blástica e um com LLA CR3). Os 10 pacientes que não desenvolveram DECHa neste grupo foram também classificados no grupo de DMA (50%) ou como LM (25%).



**Figura 8 – Percentagens das variáveis clínicas e biológicas dos pacientes submetidos ao TCTH.**

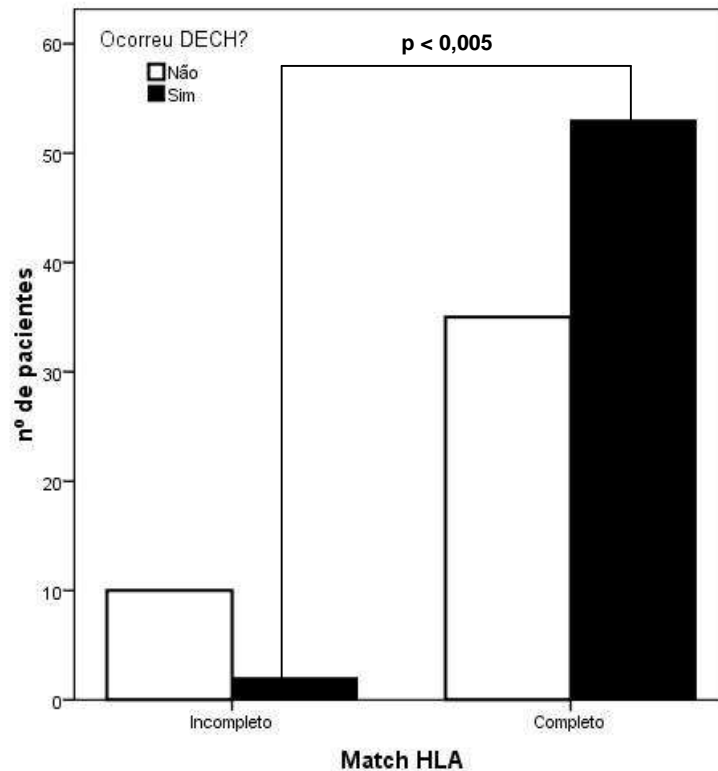
Entretanto, 6 destes 10 pacientes receberam células da SCUP, o que por si só confere menor ocorrência de DECHa. Também 2 dos 3 pacientes que receberam células originadas de medula óssea foram a óbito antes do dia 25. Portanto, não foi possível avaliar corretamente DECHa neste grupo.

**Tabela III – Chance de risco para a ocorrência de DECH aguda, de acordo com as diferentes variáveis.**

		Odds ratio (OR)	95% CI	P
<b>Fonte de células</b>	MO x SPM	0,94	0,65 – 1,35	0,823
	MO x SCUP	2,25	0,66 – 7,64	0,136
	SPM x SCUP	2,40	0,69 – 8,25	0,117
<b>Match HLA</b>	Completo x incompleto	3,61	1,00 – 19,95	0,005
	DNM x DMP	1,22	0,73 – 2,04	0,555
<b>Estágio da doença de base</b>	DNM x DMA	1,06	0,66 – 1,69	1,000
	DNM x LM	1,16	0,66 – 2,04	0,743
	DMA x DMP	1,36	0,86 – 2,12	0,272
	LM x DMP	1,25	0,74 – 2,10	0,538
	DMA x LM	1,09	0,65 – 1,83	0,777
<b>Regime de condicionamento</b>	Mieloablativo x intensidade reduzida	1,13	0,74 – 1,73	0,655
<b>Idade</b>	Menos de 18 anos x mais de 18 anos	1,52	0,96 – 2,40	0,055
<b>Sexo</b>	Masculino x feminino	1,31	0,86 – 2,00	0,204
<b>Relação do doador</b>	Relacionado x não relacionado	1,91	0,96 – 3,79	0,038

Legenda: MO – medula óssea; SPM – sangue periférico mobilizado; SCUP – sangue de cordão umbilical; DNM – doença não-maligna; DMP – doença maligna precoce; DMA – doença maligna avançada; LM – linfomas e mielomas.

No grupo HLA match completo, a maior porcentagem de pacientes que desenvolveram DECHa também foi no grupo de doenças malignas avançadas (DMA) (19,8%), seguida pelos grupos de doenças malignas precoces (DMP) (17,1%), doenças não malignas (DNM) e linfomas e mielomas (LM) (12,5% e 11,4%, respectivamente). Nestes, 34 de 53 pacientes (64,1%) receberam células originadas da MO, enquanto 18 pacientes (33,9%) receberam células originadas de SPM e apenas 1 paciente recebeu células originadas de SCUP. Além disso, 51 dos 53 pacientes deste grupo (96,2%) receberam células de doadores relacionados. Curiosamente, este grupo compreende os 6 casos de mortalidade por DECH aguda. A mortalidade ocorreu em 3 pacientes com DMA, 1 paciente com DMP e 2 pacientes com DNM (FA e HPN).



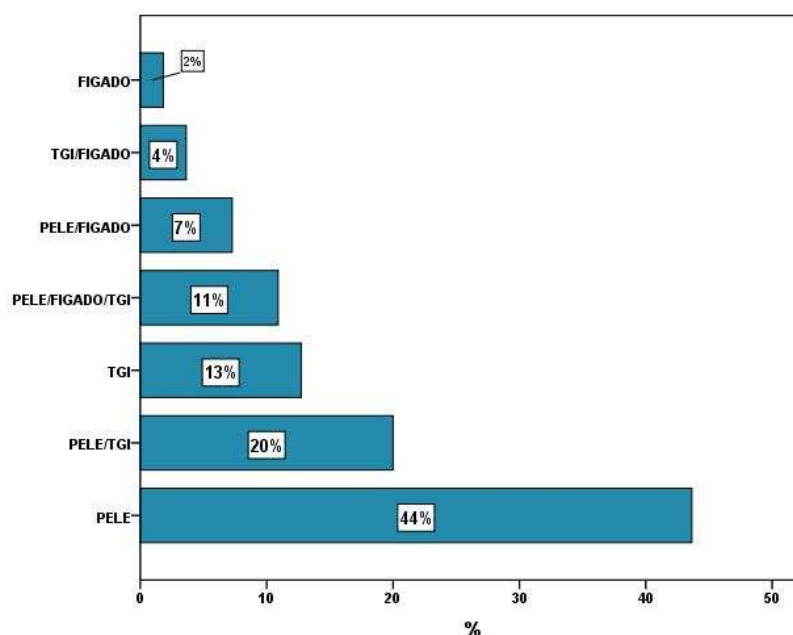
**Figura 9 - Ocorrência de DECH aguda de acordo com a compatibilidade de HLA.** Diferenças significativas encontradas na análise univariada, representados em gráficos. Barras pretas representam os doentes afetados pela doença, enquanto barras brancas representam pacientes não acometidos pela doença.

Estes resultados sugerem que o risco de desenvolvimento de DECHa não está correlacionado com apenas uma variável clínica como incompatibilidade de HLA, mas comparando estes resultados com os dados na tabela III, podemos ver que, mesmo sem significância estatística, algumas variáveis podem ser selecionadas como importante. Fonte de células (MO x SPM), doença maligna avançada e idade acima de 18, bem como doadores relacionados ou não e compatibilidade de HLA devem ser considerados para identificar o risco de desenvolvimento de DECHa.

Nós realizamos uma análise multivariada na tentativa de verificar se várias variáveis clínicas podiam interferir simultaneamente no aparecimento da doença, mas nós não encontramos nenhuma correlação significativa nesta análise. Portanto, as variáveis atuam de maneiras independentes.

### 1.3. Relações entre as variáveis clínicas e biológicas e os riscos de desenvolver DECH aguda nos diferentes órgãos.

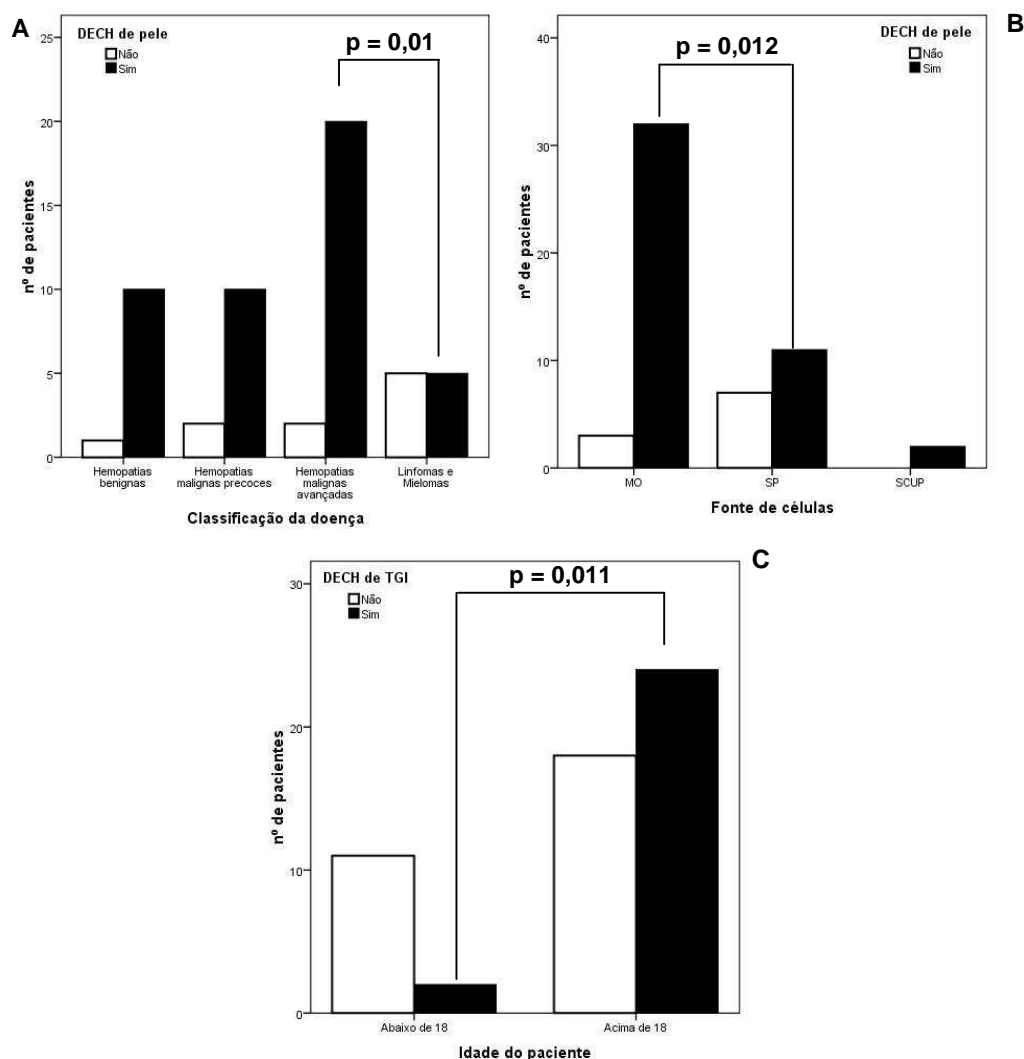
Nós também investigamos a ocorrência de DECHa de acordo com os diferentes órgãos alvos da doença e as diferentes variáveis clínicas e biológicas. A figura 10 mostra o percentual de DECHa em cada órgão envolvido. A maioria dos pacientes que desenvolveram DECHa teve somente a pele afetada (44%). 20% dos pacientes tiveram envolvimento da pele e do trato gastrointestinal, 13% tiveram envolvimento apenas do trato gastrointestinal e 11% tiveram envolvimento apenas do trato gastrointestinal e fígado. A combinação de pele e fígado, trato gastrointestinal e fígado, ou somente fígado foram responsáveis por 13% dos casos de DECHa (7%, 4% e 2% respectivamente). Quando analisamos apenas a participação de cada órgão, observamos que a pele é o órgão mais afetado, representando 81,8% de todos os casos de DECHa. Em seguida, o órgão mais afetado é o trato gastrointestinal, representando 41,3% dos casos e, finalmente, o fígado, com 23,6% dos casos.



**Figura 10 - Frequência da DECH aguda por órgão.**

Também foi avaliado a chance de risco (OR) da ocorrência de DECHa com as variáveis clínicas e biológicas, de acordo com os diversos órgãos afetados pela doença (Tabela IV). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a ocorrência de DECHa de pele e a classificação da doença de base (OR de 1,89, CI 95% 1,01 a 3,55, na comparação entre doenças malignas avançadas e linfomas e mielomas,  $p = 0,010$ ) (Figura 11A), para a ocorrência de DECHa de pele e diferentes fontes de

células (OR de 1,49, IC 95% 1,02 a 2,19 na comparação entre pacientes recebendo MO e SPM,  $p = 0,012$ ) (Figura 11B), e para a ocorrência de DECHa de GT e idade dos pacientes (OR de 3,71, IC 95% 1,01 a 13,64, na comparação entre pacientes acima de 18 anos e abaixo de 18 anos,  $p = 0,011$ ) (figura 11C). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as outras relações analisadas.



**Figura 11 - Diferenças significativas encontradas na análise univariada, representados em gráficos.** Barras pretas representam os doentes afetados pela doença, enquanto barras brancas representam pacientes não acometidos pela doença. A - A ocorrência de DECH aguda da pele em comparação com o status da doença subjacente, B - Ocorrência de pele DECH aguda, em comparação com fonte de células utilizadas em transplantes; C - Ocorrência de DECH no trato gastrointestinal, comparando com a idade dos doentes abaixo e acima de 18 anos.

Tabela IV – Chance de risco para a ocorrência de DECHa de acordo com as diferentes variáveis clínicas e com o órgão acometido pela DECHa.

		DECHa Pele		DECHa Fígado		DECHa TGI	
		OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
<b>Fonte de células</b>	MO x SPM	1,49 (1,02 – 2,19)	0,012	0,82 (0,31 – 2,15)	0,743	0,65 (0,37 – 1,13)	0,161
	MO x SCUP	Não estimado		Não estimado		0,80 (0,18 – 3,39)	1,000
	SPM x SCUP	Não estimado		Não estimado		1,22 (0,29 – 5,12)	1,000
<b>Match HLA</b>	Completo x incompleto	Não estimado		0,45 (0,10 – 1,97)	0,402	0,94 (0,22 – 1,49)	1,000
	DNM x DMP	1,13 (0,82 – 1,55)	0,613	2,04 (0,40 – 10,24)	0,619	0,51 (0,17 – 1,49)	0,246
	DNM x DMA	0,95 (0,77 – 1,18)	1,000	1,72 (0,41 – 7,12)	0,640	0,57 (0,19 – 1,68)	0,442
<b>Estágio da doença de base</b>	DNM x LM	1,81 (0,95 – 3,47)	0,063	0,54 (0,17 – 1,71)	0,386	0,45 (0,15 – 1,35)	0,198
	DMA x DMP	1,18 (0,90 – 1,55)	0,299	1,18 (0,22 – 6,20)	1,000	0,88 (0,45 – 1,73)	0,999
	LM x DMP	0,62 (0,32 – 1,22)	0,193	3,75 (0,89 – 15,69)	0,075	1,12 (0,56 – 2,24)	1,000
	DMA x LM	1,89 (1,01 – 3,55)	0,010	0,31 (0,09 – 1,07)	0,083	0,78 (0,39 – 1,57)	0,699
<b>Regime de condicionamento</b>	Mieloablativo x intensidade reduzida	1,19 (0,83 – 1,70)	0,422	0,39 (0,16 – 0,98)	0,070	1,43 (0,66 – 3,07)	0,366
<b>Idade</b>	Menos de 18 anos x mais de 18 anos	0,76 (0,64 – 0,90)	0,095	3,71 (0,53 – 25,92)	0,155	3,71 (1,01 – 13,64)	0,011
<b>Sexo</b>	Masculino x feminino	1,15 (0,83 – 1,61)	0,443	2,06 (0,51 – 8,23)	0,317	0,70 (0,40 – 1,22)	0,364
<b>Relação do doador</b>	Relacionado x não relacionado	0,79 (0,69 – 0,91)	0,347	0,40 (0,15 – 1,07)	0,136	0,93 (0,39 – 2,20)	1,000

Legenda: MO – medula óssea; SPM – sangue periférico mobilizado; SCUP – sangue de cordão umbilical; DNM – doença não-maligna; DMP – doença maligna precoce; DMA – doença maligna avançada; LM – linfomas e mielomas.



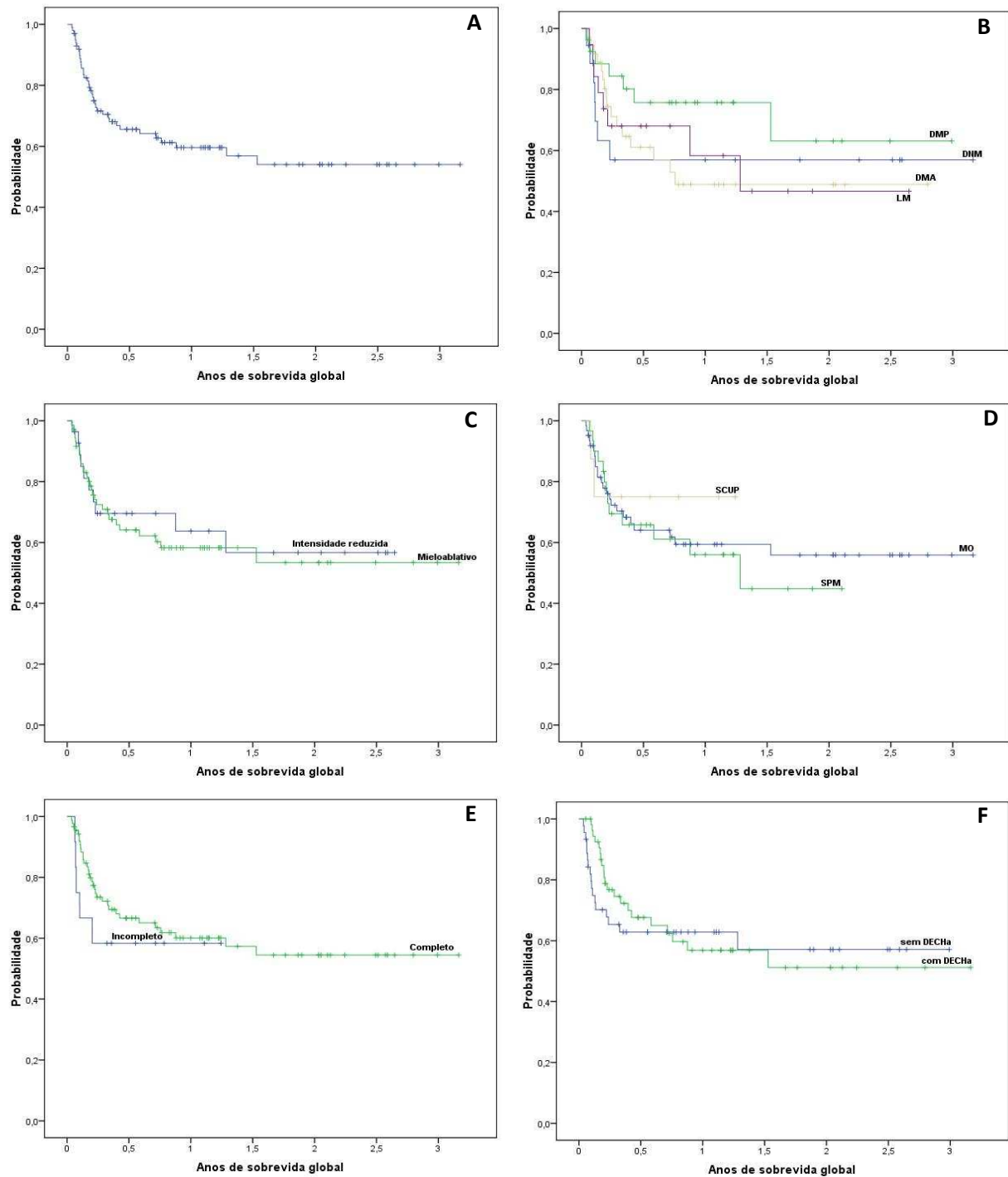
#### **1.4. Sobrevida global**

Estes pacientes foram acompanhados pelo tempo médio de 690 dias (variação de 13-1155 dias). Durante este período, 38 pacientes morreram. As causas da morte incluíram recidivas ou progressão da doença na ausência de rejeição em 8 pacientes, DECHa em 6 pacientes, a infecção em 16 pacientes e toxicidade relacionada ao tratamento em 7 pacientes, e 1 paciente faleceu de causa desconhecida. A sobrevida global (OS), após 1 ano foi de 59,6% (Figura 12A). A OS também foi observada quando os pacientes foram estratificados em grupos diferentes.

Nossa primeira análise foi a OS de acordo com a gravidade da doença de base. Após um ano, a OS foi de 56,9% para doenças não-malignas, 74,8% para o grupo de doenças malignas precoces e 58,3% para linfoma e mieloma. Além disso, em doentes que tinham doenças malignas avançadas, a OS após 1 ano foi de 46,4% (Figura 12B).

Também analisamos a OS de acordo com a fonte de células-tronco. Após 1 ano do transplante, a probabilidade de o paciente estar vivo foi de 59,4% quando foram usadas células de MO, 56% para células obtidas de SPM e 75% para as células originadas de SCUP (Figura 12C). De acordo com o tipo de condicionamento recebido, o grupo que recebeu condicionamento de intensidade reduzida teve uma probabilidade de 63,7% para permanecer vivo após um ano do transplante, enquanto que o grupo que recebeu condicionamento mieloablativo teve uma probabilidade de 58,3% de estar vivo após um ano de transplante (Figura 12D). De acordo com a compatibilidade do HLA, os pacientes que HLA compatível apresentaram cerca de 60,1% de chances de permanecer vivo um ano após o transplante, enquanto que em pacientes que possuíam HLA incompatível, esta probabilidade foi reduzida para 58,3% (Figura 12E). Não houve diferença estatisticamente significativa para a ocorrência de morte em todos os grupos ( $p > 0,1$  em todos os casos).

Para determinar se a presença ou ausência de DECHa influencia sobre a sobrevivência, analisamos a OS de acordo com a ocorrência da doença. Como podemos ver na Figura 12F, a sobrevida global do grupo que desenvolveu DECHa foi de 56,9% após um ano de TMO, enquanto que em pacientes que não desenvolveram DECHa, a sobrevida após um ano foi de 62,8%. Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,1$ ).



**Figura 12 - Sobrevida Global.** A – Curva de sobrevivida dos 100 pacientes que sofreram TCTH no nosso centro, B, C, D, E e F – Curva de sobrevivida dos 100 pacientes que sofreram TCTH no nosso centro, separadas por diferentes variáveis. B – Estágio da doença de base; C - Regime de condicionamento; D - Fonte de células; E - Compatibilidade de HLA; F - Ocorrência de DECH aguda. Não houve diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos ( $p > 0,1$ ). DMP – doenças malignas precoces; DNM - doenças não-malignas, LM - linfoma e mieloma; DMA – doenças malignas avançadas; SCUP - sangue de cordão umbilical, MO - medula óssea, SPM - sangue periférico.

A partir do momento que estabelecemos quais critérios clínicos estão relacionados com o aparecimento da DECHa, nós iniciamos a análise dos diferentes parâmetros biológicos, correlacionando sempre com a clínica da doença. Como dito anteriormente, está descrito na literatura que as citocinas estão diretamente envolvidas na patogenia da doença. Sendo assim, o estudo de algumas citocinas foi nosso primeiro alvo de estudo.

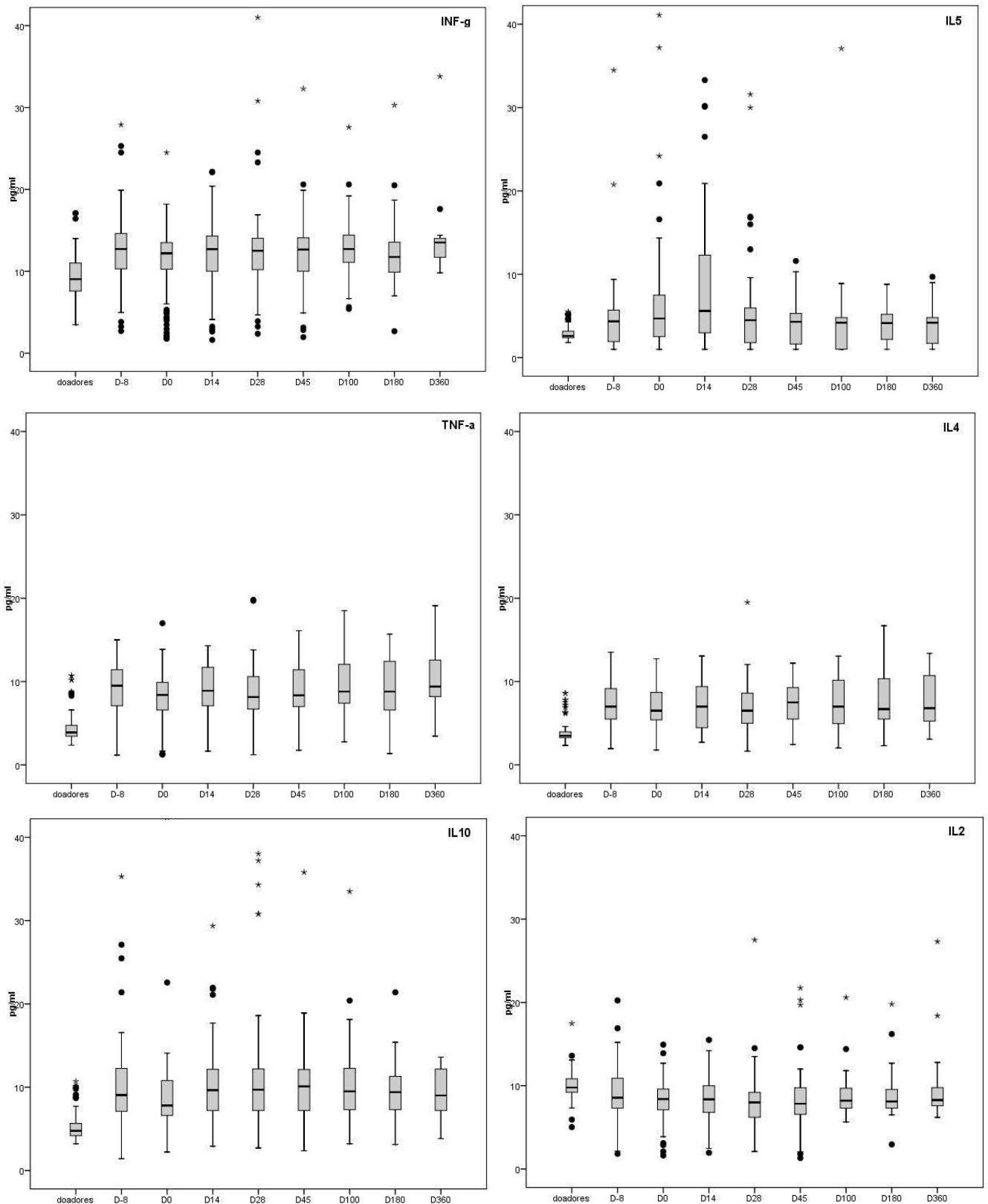
## **2. Análise das citocinas como biomarcadores da DECHa.**

### **2.1. Citocinas no plasma**

Apesar de várias citocinas já terem sido correlacionadas com a ocorrência de DECHa, os resultados existentes na literatura são controversos e até hoje não possuem utilidade na clínica. Assim sendo, mais estudos que correlacionem as citocinas e outras moléculas com variáveis clínicas e o aparecimento da DECHa são necessários para a identificação de biomarcadores de utilidade clínica.

Neste sentido, nós iniciamos este estudo analisando algumas citocinas presente no plasma de pacientes submetidos ao transplante alogênico. Amostras de sangue de 100 pacientes foram coletados prospectivamente em dias específicos, como descrito em métodos. Nós acompanhamos estes pacientes durante um ano. A figura 13 mostra a mediana das citocinas obtidas em diferentes dias antes e após o TCTH. Comparamos a mediana obtida nos diferentes dias com a mediana obtida de 80 doadores saudáveis.

Como podemos observar na figura 13, a mediana dos pacientes possui um desvio maior do que quando comparados com a mediana dos doadores já no pré-transplante, muito provavelmente pelas condições clínicas destes pacientes, que se encontram em um estágio inflamatório antes mesmo do transplante.



**Figura 13 – Distribuição dos níveis séricos de algumas citocinas de acordo com os diferentes dias de acompanhamento.**

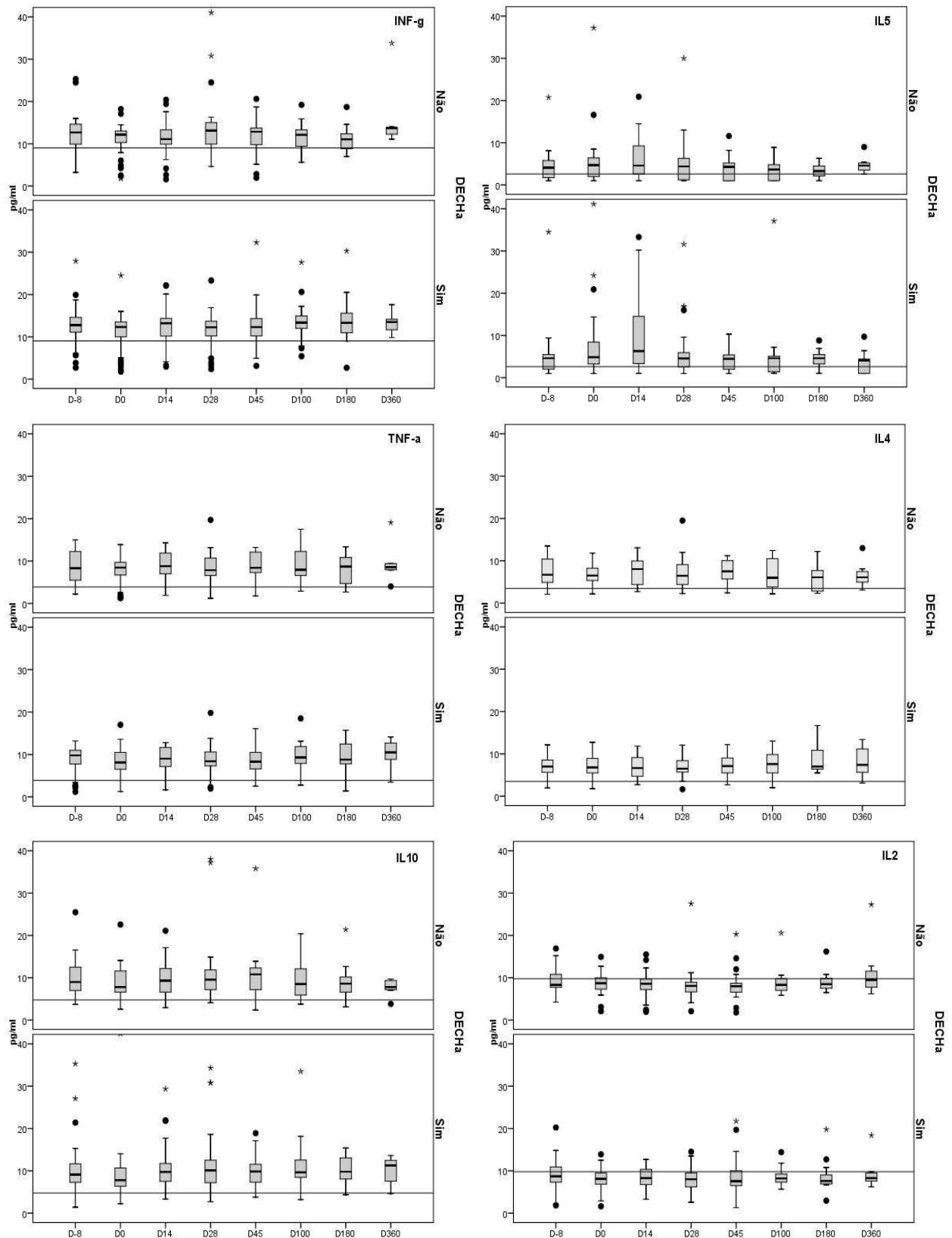
## **2.2. Análise da relação entre o aumento das concentrações de citocinas e o risco de desenvolver DECHa.**

Estes pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes que desenvolveram DECHa e pacientes que não desenvolveram DECHa. A mediana das citocinas obtidas nos diferentes dias após o transplante foram plotadas em gráficos, comparando as medianas entre os dois grupos e também com a mediana obtida de doadores saudáveis, como pode ser visto na Figura 14.

Entre as 6 citocinas estudadas, com exceção da IL-2, todos tinham níveis mais elevados de citocinas no pré-transplante do que a mediana encontrada em doadores saudáveis. No entanto, IL-5 é a citocina mais elevados durante o acompanhamento de pacientes que desenvolveram DECHa, especialmente no D+14, quando comparados com pacientes sem DECHa [mediana  $\pm$  erro padrão (EP)  $6,30 \pm 1,36$  x  $4,45 \pm 2,29$  pg/ml, respectivamente] (Figura 14). Os níveis de IL-5 também são elevados em comparação com a mediana obtida de doadores saudáveis. A mediana de IFN- $\gamma$  no D+14 também foi maior em pacientes com DECHa do que nos pacientes sem a doença ( $13,20 \pm 4,28$  x  $11,10 \pm 4,02$  pg/ml, respectivamente).

Não houve diferença significativa entre os grupos com e sem DECHa nas 4 outras citocinas, e não houve grandes diferenças quando comparados com os doadores saudáveis. Entre os grupos, existem variações no decorrer do acompanhamento após o transplante, mas essas variações não são constantes, e não são estatisticamente significantes.

A partir destas medianas obtidas, resolvemos estabelecer um ponto de corte para classificar as citocinas nestes pacientes, desenvolvendo uma melhor forma de avaliá-las. Sendo assim, fizemos uma análise de curva ROC para tentar selecionar o melhor ponto de corte e estratificarmos as concentrações de citocinas nos determinados dias acima ou abaixo deste ponto. Este ponto encontrado através da curva ROC, em todos os casos, ficou sempre muito perto da mediana, então, resolvemos utilizar a própria mediana como ponto de corte. Nós categorizamos todas as concentrações acima ou abaixo da mediana e fizemos o cálculo da chance de risco (odds ratio) de ocorrência de doença enxerto de acordo com o aumento ou não das citocinas (tabela V).



**Figura 14 – Distribuição dos níveis séricos de algumas citocinas nos diferentes dias, de acordo com o aparecimento ou não de DECHA. A linha no gráfico indica a mediana de citocinas obtidas de doadores saudáveis.**

**Tabela V – Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das citocinas nos diferentes dias.**

	D+14		D+28		D+45	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	2,44 (1,03-5,80)	0,033	0,80 (0,32-1,99)	0,409	0,57 (0,21-1,54)	0,198
<b>IL-5</b>	2,06 (0,85-7,99)	0,083	1,24 (0,51-3,04)	0,398	1,60 (0,59-4,32)	0,249
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,83 (0,35-1,99)	0,427	1,11 (0,41-3,02)	0,515	0,59 (0,21-1,65)	0,228
<b>IL-4</b>	0,60 (0,29-1,48)	0,192	1,17 (0,45-3,05)	0,467	0,79 (0,26-2,20)	0,413
<b>IL-10</b>	1,13 (0,48-2,64)	0,473	1,30 (0,53-3,20)	0,359	0,68 (0,25-1,82)	0,307
<b>IL-2</b>	0,62 (0,26-1,45)	0,191	1,43 (0,52-3,96)	0,329	1,58 (0,51-4,85)	0,300

Como podemos ver, a concentração plasmática do IFN- $\gamma$  no D+14 teve alterações estatisticamente significativas neste dia, com um odds ratio (OR) de 2,44, 95% de intervalo de confiança de 1,03–5,80,  $p=0,033$ , quando os pacientes foram categorizados de acordo com o ponto de corte de 12,74 pg/ml. A IL-5 também ficou aumentada no D+14, com uma OR de 2,06, 95%CI 0,85 - 7,99, com um valor de  $p=0,083$ , sugerindo uma tendência de ter significância estatística. Neste caso, o ponto de corte utilizado foi 4,70 pg/ml.

### 2.3. *Análise da relação entre o aumento das concentrações das citocinas e o risco de desenvolver DECHa nos diferentes órgãos-alvo da doença.*

A DECHa ocorre na pele, fígado e trato gastrointestinal. Wysocki e colaboradores sugerem que cada órgão tem um grupo de citocinas agindo independentemente (Wysocki *et al.*, 2005). Com base na literatura, nós decidimos verificar essas citocinas de acordo com o órgão afetado pela doença. Nós dividimos os pacientes de acordo com o desenvolvimento de DECHa e calculamos a chance de risco destes pacientes desenvolverem DECHa, relacionando o aumento das citocinas de acordo com o órgão afetado (Tabela VI).

Nós encontramos diferenças estatisticamente significativas para o IFN- $\gamma$  no D+14 em pacientes que desenvolveram DECHa de pele. Pacientes que tinham IFN- $\gamma$  superior a 12,74 pg/ml (ponto de corte) no D+14 tiveram aumentado o risco de desenvolver DECHa pele (OR = 8,57, IC 95% 0,99-73,94,  $p = 0,025$ ).

Nós encontramos diferenças estatisticamente significativas para DECHa de fígado. O aumento de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 no D+45 conferiu menor risco para o desenvolvimento de DECHa de fígado. Aqueles que possuíam as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 maior que o ponto de corte no D+45, apresentaram menor possibilidade de desenvolver DECHa de fígado [0,08 (0.01-0.54), p=0,007; 0,11 (0.01-1.04), p=0,010; 0,07 (0.00-0.69), p=0,008, respectivamente]. Assim, o aumento dessas citocinas confere proteção para DECHa no fígado, mas o mesmo não ocorreu para a DECHa de pele e trato gastrointestinal. O aumento dessas citocinas acima do ponto de corte aumentou o risco de desenvolver DECHa nestes dois tecidos no D+45, mas sem significância estatística.

**Tabela VI – Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das citocinas nos diferentes dias, separado por órgão acometido pela DECHa.**

		D+14		D+28		D+45	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
IFN- $\gamma$	DECHa pele	8,57 (0,99-73,94)	0,025	3,23 (0,55-18,75)	0,172	0,80 (0,19-3,44)	0,535
	DECHa fígado	0,85 (0,23-3,12)	0,541	0,30 (0,06-1,38)	0,109	0,73 (0,15-3,46)	0,499
	DECHa TGI	0,47 (0,15-1,46)	0,153	0,71 (0,22-2,28)	0,393	1,20 (0,34-4,24)	0,510
IL-5	DECHa pele	0,53 (0,12-2,34)	0,321	0,47 (0,10-2,17)	0,275	1,00 (0,24-4,13)	0,640
	DECHa fígado	2,22 (0,60-8,27)	0,192	0,90 (0,22-3,62)	0,580	1,00 (0,21-4,66)	0,651
	DECHa TGI	0,51 (0,12-2,11)	0,284	0,84 (0,27-2,62)	0,500	0,55 (0,15-1,91)	0,265
TNF- $\alpha$	DECHa pele	2,15 (0,52-8,76)	0,234	0,90 (0,15-5,31)	0,642	1,62 (0,36-7,18)	0,389
	DECHa fígado	0,83 (0,22-3,06)	0,516	1,02 (0,22-4,72)	0,647	0,08 (0,01-0,54)	0,007
	DECHa TGI	2,40 (0,72-7,93)	0,123	3,21 (0,83-12,44)	0,078	0,75 (0,20-2,84)	0,467
IL-4	DECHa pele	3,28 (0,70-15,27)	0,117	8,46 (0,88-80,59)	0,070	1,34 (0,29-6,13)	0,500
	DECHa fígado	0,90 (0,23-3,51)	0,574	0,73 (0,15-3,46)	0,499	0,11 (0,01-1,04)	0,010
	DECHa TGI	2,53 (0,75-8,44)	0,109	0,64 (0,18-2,23)	0,352	1,27 (0,32-4,97)	0,499
IL-10	DECHa pele	1,05 (0,26-4,18)	0,610	2,63 (0,45-15,23)	0,245	1,70 (0,40-7,19)	0,359
	DECHa fígado	0,50 (0,13-1,83)	0,234	0,20 (0,03-1,07)	0,049	0,07 (0,00-0,69)	0,008
	DECHa TGI	0,67 (0,22-2,04)	0,340	0,58 (0,18-1,88)	0,273	1,21 (0,35-4,18)	0,499
IL-2	DECHa pele	1,15 (0,28-4,76)	0,557	0,28 (0,03-2,62)	0,241	2,55 (0,59-11,00)	0,183
	DECHa fígado	0,60 (0,16-2,18)	0,327	1,21 (0,26-5,57)	0,560	0,41 (0,08-2,00)	0,239
	DECHa TGI	0,49 (0,15-1,57)	0,182	0,50 (0,14-1,79)	0,230	0,35 (0,09-1,33)	0,111

Com as duas análises univariadas (DECHa total e separada por órgão), nós encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com ou sem



DECHa para as citocinas IL-5 e IFN- $\gamma$  no D+14, predizendo um aumento da doença, e o aumento de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 no D+45 confere uma proteção do desenvolvimento de DECHa no fígado. Como nosso objetivo é encontrar uma molécula que possa ser usado para predizer precocemente o aparecimento de DECHa, decidimos realizar a próxima análise apenas para IFN- $\gamma$  e IL-5 no D+14.

#### **2.4. Correlação do aumento dos níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$ com as diferentes variáveis clínicas-biológicas.**

Desde que os parâmetros clínicos foram heterogêneos, nós decidimos analisar os dados de acordo com diversas variáveis clínicas. Na tentativa de compreender melhor a relação entre níveis de IL-5 e IFN- $\gamma$  com a ocorrência de DECHa, realizamos uma análise multivariada por regressão logística. Em um estudo de correlação destas duas citocinas no D+14 com diversas variáveis clínicas-biológicas (compatibilidade HLA, idade, sexo, origem das células-tronco, relação dos doadores, regime de condicionamento, estado da doença de base), descobrimos que estas citocinas são independentes dessas variáveis, com exceção do regime de condicionamento e idade.

Nos pacientes que receberam condicionamento mieloablativo, o aumento de IL-5 e IFN- $\gamma$  acima do ponto de corte no D+14 em pacientes com DECHa teve significância estatística quando comparados com pacientes que não desenvolveram DECHa, mas receberam o mesmo tipo de condicionamento [OR = 2,30 (1.48-6.75),  $p$  = 0,042 para IL-5 e OR = 5,01 (1.67-15.03),  $p$  = 0,003 para IFN- $\gamma$ ]. Quando comparados de acordo com a idade, apenas a IL-5 teve significância estatística [OR = 3,12 (1.03-9.45),  $p$  = 0,038] nos pacientes acima de 18 anos. Não foi observada significância estatística para o regime de intensidade reduzida e para pacientes com menos de 18 anos, como mostra a tabela VII.

**Tabela VII – Relação entre IFN- $\gamma$  e IL-5 no D+14, e variáveis clínicas**

		<b>OR IFN-<math>\gamma</math> no D+14</b>	<b><i>p</i></b>	<b>OR IL-5 no D+14</b>	<b><i>p</i></b>
		<b>(95%CI)</b>		<b>(95% CI)</b>	
Regime de condicionamento	Mieloablativo	5,01 (1,67 – 15,03)	0,003	2,30 (1,48 – 6,75)	0,042
	Intensidade reduzida	0,53 (0,11 – 2,55)	0,348	1,60 (0,32 – 7,84)	0,430
Idade	Acima de 18 anos	2,40 (0,83 – 6,97)	0,086	3,12 (1,03 – 9,45)	0,038
	Abaixo de 18 anos	1,83 (0,37 – 8,98)	0,363	1,33 (0,24 – 7,34)	0,543

### **2.5. Análise das citocinas em biópsias de pele.**

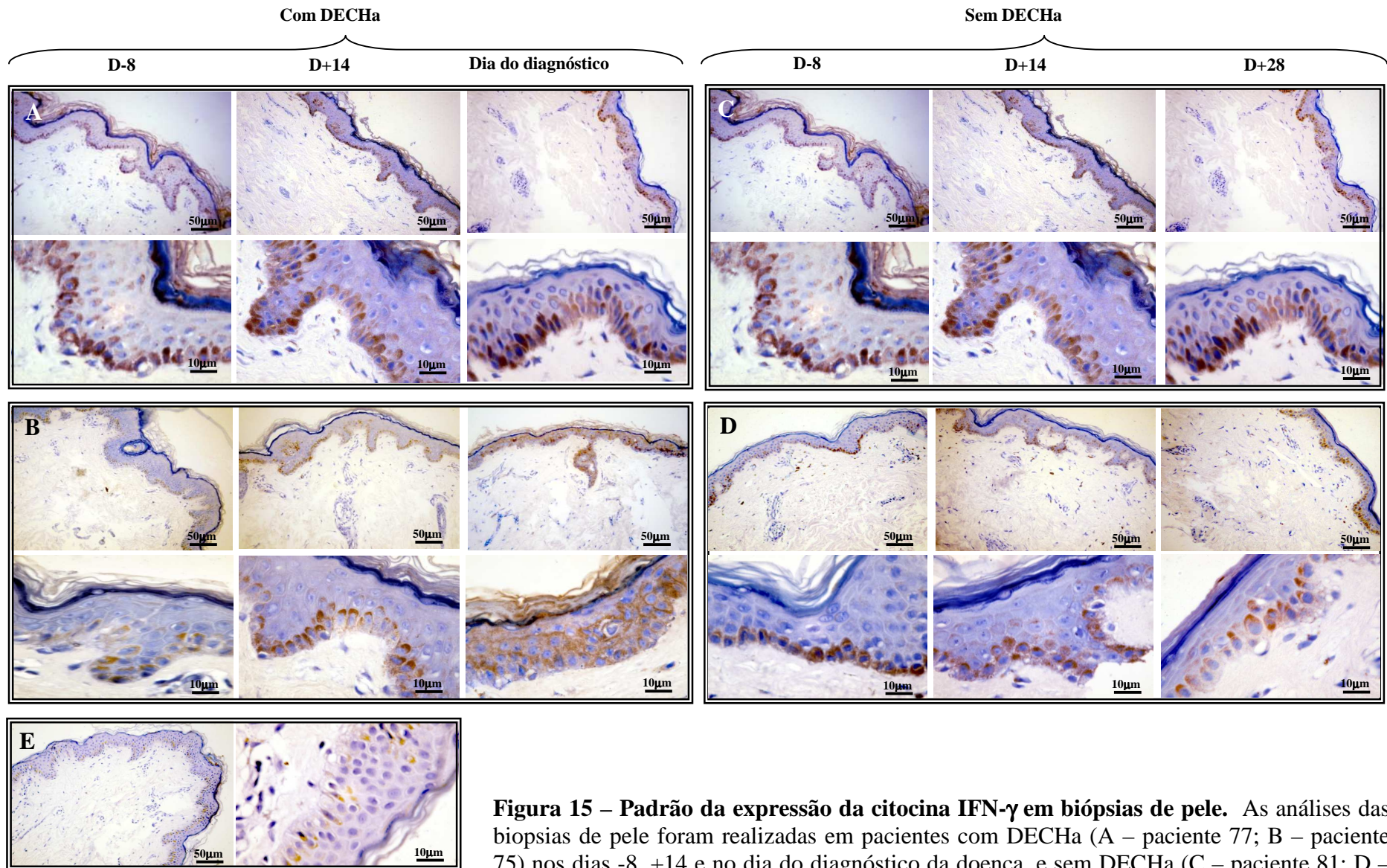
Além de utilizar o Kit CBA para medir a concentração de citocinas plasmáticas, verificamos também a distribuição das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram a DECHa.

As citocinas são moléculas de baixo peso molecular que atuam como mensageiras do sistema imune. Estas moléculas estão envolvidas em diversos processos celulares. Na DECHa, as citocinas promovem a ativação dos tecidos-alvos da doença, fazendo com que este tecido atraia células efetoras da doença.

Portanto, decidimos analisar a expressão de IFN- $\gamma$  na pele de alguns pacientes submetidos a transplante antes do regime de condicionamento, no D-8, no D+14 e no diagnóstico de DECHa, comparando com biópsias de pele dos dias D-8, D+14 e D+28 de pacientes que não desenvolveram a doença. Como controle, utilizamos biópsias de pele de doadores saudáveis.

A Figura 15 mostra os padrões encontrados nos pacientes estudados. Foram analisadas 32 biópsias de pacientes (8 sem DECHa e 24 com DECHa). Observamos que, em todos os casos, os pacientes no D-8 dos dois grupos mostram marcação positiva para IFN- $\gamma$  na pele (A, B, C e D D-8). Quando comparado com amostras de pele de doadores saudáveis (Figura 15E) verificamos um aumento da marcação. Durante o acompanhamento, alguns pacientes com DECHa apresentam um aumento na intensidade de coloração no D+14 e no dia do diagnóstico da doença. Conseguimos também observar algumas células infiltradas na derme e epiderme em alguns casos (Figura 15B), porém na maior parte dos casos a marcação encontra-se limitada a lâmina basal da epiderme. Já outros pacientes, também com a doença, não apresentaram aumento da concentração desta molécula em biópsias de pele, e outros apresentam até uma diminuição da marcação quando comparados o D-8 e o dia do diagnóstico da doença, conforme pode ser visto na Tabela X.

Já os pacientes que não apresentaram a doença, alguns também mostram um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  no D+14 e no D+28 (Figura 15C); por outro lado, alguns pacientes tiveram um aumento no D+14 e uma diminuição no D+28 na expressão de IFN- $\gamma$  (Figura 15D). Nestes pacientes, a marcação também se encontra limitada a lâmina basal da epiderme. Estes resultados sugerem que esta molécula não pode ser utilizado nem como marcador precoce, nem como marcador da doença em



**Figura 15 – Padrão da expressão da citocina IFN- $\gamma$  em biópsias de pele.** As análises das biópsias de pele foram realizadas em pacientes com DECHa (A – paciente 77; B – paciente 75) nos dias -8, +14 e no dia do diagnóstico da doença, e sem DECHa (C – paciente 81; D – paciente 76) nos dias -8, +14 e +28. Essas biópsias foram comparadas com biópsias de pele de indivíduos saudáveis (E).

biópsias de pele, pois o aumento da intensidade de marcação está presente em pacientes com a doença ou não.

Apesar de não termos encontrados diferenças estatisticamente significativas, nós também analisamos a citocina TNF- $\alpha$  nas biópsias de pele destes pacientes. A figura 16 mostra os padrões desta citocina encontradas em pacientes com DECHa ou não.

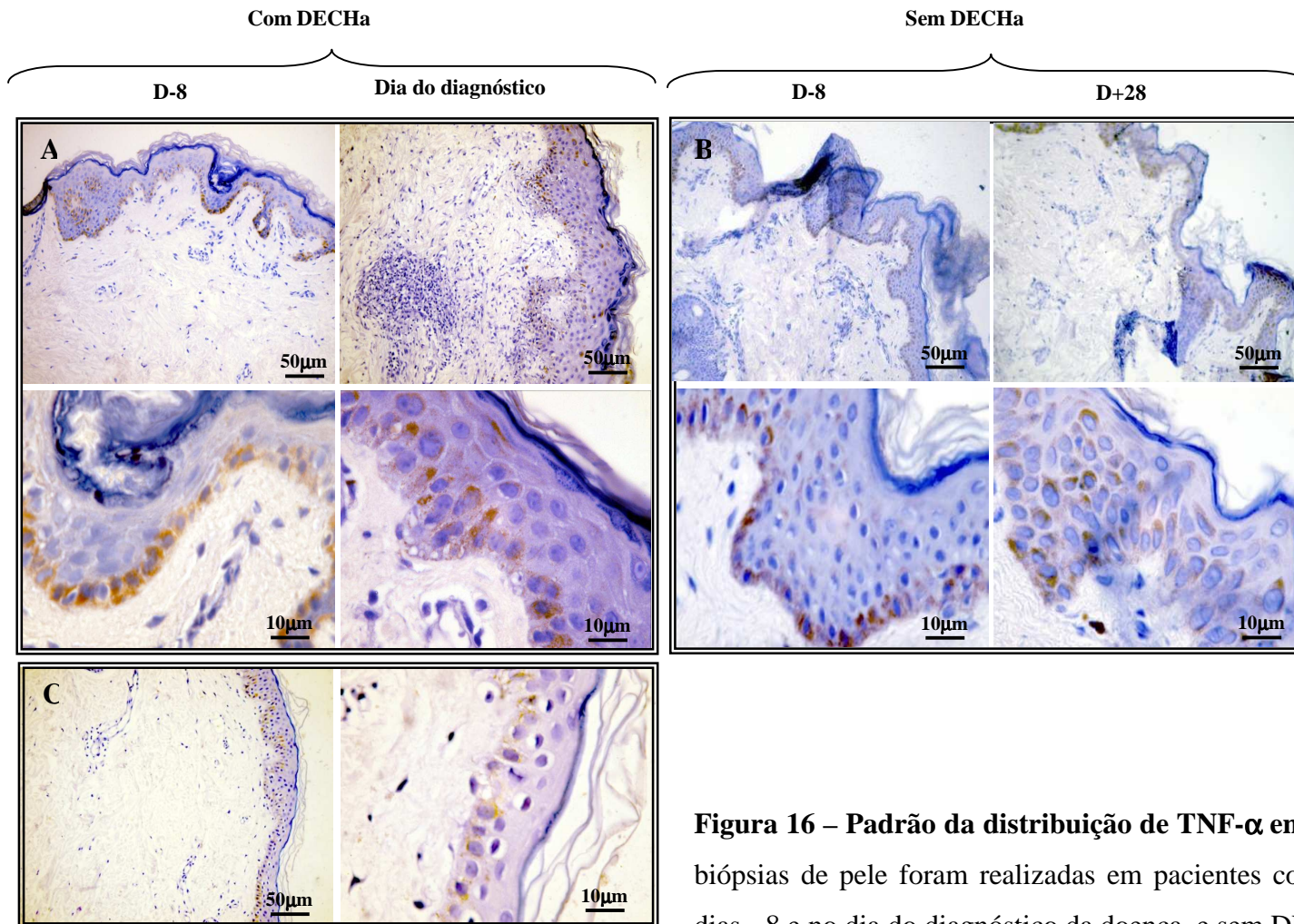
Observando a figura 16, podemos ver que tanto o paciente com DECHa quanto o paciente que não manifestou a doença apresentam marcação positiva para TNF- $\alpha$  antes mesmo do condicionamento. A biópsia de pele de indivíduos saudáveis também apresentou uma pequena marcação limitada à lâmina basal da epiderme, porém, esta marcação é menor do que a encontrada nos pacientes no D-8. A marcação nos pacientes antes do transplante provavelmente ocorre devido ao tratamento realizado por estes pacientes para controle da doença de base. Apesar disso, nós conseguimos observar no paciente que desenvolveu a doença um discreto aumento na intensidade de coloração. O mesmo não ocorre nos pacientes que não desenvolveram a DECHa.

A partir da análise das imunohistoquímicas, tentamos estabelecer um padrão para a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes que desenvolveram ou não a doença. A forma encontrada foi categorizar as imunohistoquímicas realizadas de acordo com a intensidade de coloração, conforme a tabela VIII.

Os pacientes que apresentaram a doença tiveram as citocinas analisadas no pré-transplante e no dia do diagnóstico da doença. Já os pacientes sem DECH tiveram essas citocinas avaliadas nos dias D-8 e D+28, uma vez que a média de dias obtida para os pacientes que desenvolveram DECHa foi de 45 dias, o D+28 é o dia mais próximo para avaliar os pacientes que não desenvolveram a doença.

A tabela IX mostra os resultados encontrados a partir da análise das imunohistoquímicas. Analisamos a expressão das citocinas em 24 pacientes com DECHa em diferentes órgãos e com diferentes graus de estadiamento da doença. Destes pacientes, 1 paciente teve DECHa de TGI, 15 tiveram DECHa de pele, 4 paciente tiveram acometimento de pele e TGI e 4 pacientes tiveram acometimento dos 3 órgãos.





**Figura 16 – Padrão da distribuição de TNF- $\alpha$  em biópsias de pele.** As análises das biópsias de pele foram realizadas em pacientes com DECHa (A – paciente 61) nos dias -8 e no dia do diagnóstico da doença, e sem DECHa (B – paciente 67) nos dias -8 e +28. Foram utilizado como controle biópsias de pele de indivíduos saudáveis (C).

biópsias de pele, pois o aumento da intensidade de marcação está presente em pacientes com a doença ou não.

Apesar de não termos encontrados diferenças estatisticamente significativas, nós também analisamos a citocina TNF- $\alpha$  nas biópsias de pele destes pacientes. A figura 16 mostra os padrões desta citocina encontradas em pacientes com DECHa ou não.

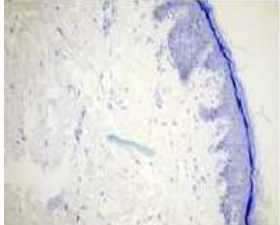
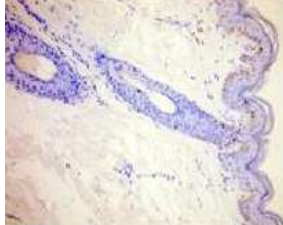
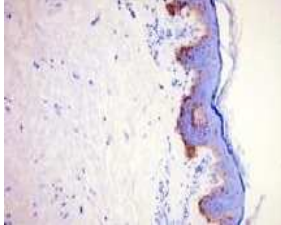
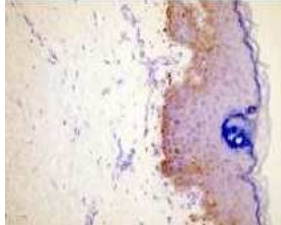
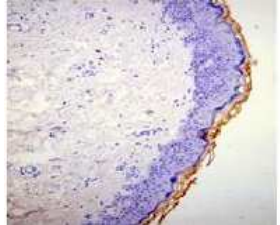
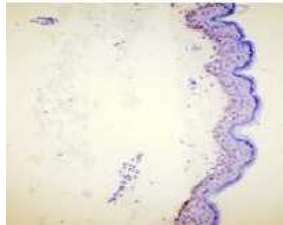
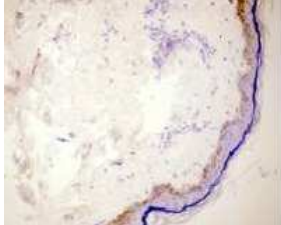
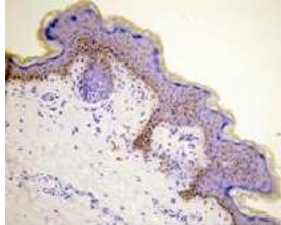
Observando a figura 16, podemos ver que tanto o paciente com DECHa quanto o paciente que não manifestou a doença apresentam marcação positiva para TNF- $\alpha$  antes mesmo do condicionamento. A biópsia de pele de indivíduos saudáveis também apresentou uma pequena marcação limitada à lâmina basal da epiderme, porém, esta marcação é menor do que a encontrada nos pacientes no D-8. A marcação nos pacientes antes do transplante provavelmente ocorre devido ao tratamento realizado por estes pacientes para controle da doença de base. Apesar disso, nós conseguimos observar no paciente que desenvolveu a doença um discreto aumento na intensidade de coloração. O mesmo não ocorre nos pacientes que não desenvolveram a DECHa.

A partir da análise das imunohistoquímicas, tentamos estabelecer um padrão para a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes que desenvolveram ou não a doença. A forma encontrada foi categorizar as imunohistoquímicas realizadas de acordo com a intensidade de coloração, conforme a tabela VIII.

Os pacientes que apresentaram a doença tiveram as citocinas analisadas no pré-transplante e no dia do diagnóstico da doença. Já os pacientes sem DECH tiveram essas citocinas avaliadas nos dias D-8 e D+28, uma vez que a média de dias obtida para os pacientes que desenvolveram DECHa foi de 45 dias, o D+28 é o dia mais próximo para avaliar os pacientes que não desenvolveram a doença.

A tabela IX mostra os resultados encontrados a partir da análise das imunohistoquímicas. Analisamos a expressão das citocinas em 24 pacientes com DECHa em diferentes órgãos e com diferentes graus de estadiamento da doença. Destes pacientes, 1 paciente teve DECHa de TGI, 15 tiveram DECHa de pele, 4 paciente tiveram acometimento de pele e TGI e 4 pacientes tiveram acometimento dos 3 órgãos.

**Tabela VIII - Graduação da intensidade de coloração obtida nas imunohistoquímicas para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas biópsias de pele dos pacientes submetidos ao TCTH.**

	Sem marcação	Marcação fraca	Marcação média	Marcação forte
IFN- $\gamma$				
TNF- $\alpha$				

Para IFN- $\gamma$ , 7 pacientes mantiveram a mesma expressão no D-8 e no dia do diagnóstico da doença, 14 pacientes tiveram um aumento na expressão desta molécula no dia do diagnóstico da doença, 1 paciente não apresentou marcação e 2 pacientes diminuíram a expressão de IFN- $\gamma$  no dia do diagnóstico quando comparados com o D-8. Já para a expressão de TNF- $\alpha$ , 11 pacientes mantiveram a mesma intensidade de coloração com o D-8, 7 pacientes tiveram aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no pós-transplante, 1 paciente não apresentou marcação e 3 pacientes diminuíram a expressão de TNF- $\alpha$  no dia do diagnóstico da DECHa quando comparados com o D-8.

Dos pacientes que não desenvolveram a doença (no total, 8 foram analisados), a maioria dos casos manteve a mesma intensidade de marcação do D-8 para o D+28, tanto para IFN- $\gamma$ , como para TNF- $\alpha$ . Apenas 2 pacientes em ambos os grupos teve um aumento na expressão destas moléculas (de fraca para média).

Portanto, estes resultados mostram que o aumento da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  está fortemente associado com o risco de desenvolver DECHa de pele e que o aumento da concentração plasmática de IL-5 aumenta o risco de desenvolver DECHa em pacientes que receberam condicionamento mieloablativo. Entretanto, a concentração de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em biópsias de pele não podem ser consideradas como marcadores

da DECHa, uma vez que estas moléculas variam no decorrer do acompanhamento e ocorrem tanto na pele de pacientes com a doença ou não.

**Tabela IX - Padrão de expressão das moléculas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram ou não DECHa.**

Pacientes	<i>IFN-<math>\gamma</math></i>		<i>TNF-<math>\alpha</math></i>		Órgão acometido
	Pré-TCTH	Dia da DECH	Pré-TCTH	Dia da DECH	
1	Fraco	Forte	Fraco	Forte	Pele
4	Fraco	Médio	Fraco	Fraco	Pele
6	Fraco	Fraco	S/M	S/M	TGI
11	Médio	Médio	Médio	Médio	Pele
12	Fraco	Médio	Médio	Médio	Pele
13	S/M	S/M	S/M	S/M	Pele
14	Fraco	Forte	Fraco	Forte	Pele
17	Fraco	Médio	Fraco	Médio	Pele
21	Médio	Forte	Fraco	Fraco	Pele
27	Fraco	Médio	Médio	Médio	Pele
31	Fraco	Médio	Fraco	Fraco	Pele
32	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Pele+TGI
39	Fraco	Forte	Médio	Médio	Pele+TGI
40	Forte	Forte	Forte	Forte	Pele+TGI+fígado
43	Fraco	Médio	Fraco	Fraco	Pele
44	Fraco	Forte	Forte	Fraco	Pele
47	Forte	Forte	Forte	Forte	Pele
51	Fraco	Médio	Fraco	Médio	Pele+TGI
54	Fraco	Médio	Médio	Forte	Pele+TGI+fígado
59	Médio	Médio	Fraco	Fraco	Pele+TGI+fígado
60	Médio	Fraco	Fraco	Fraco	Pele
61	Médio	Fraco	Médio	Fraco	Pele+TGI
75	Fraca	Média	Fraco	Médio	Pele+TGI
77	Média	Média	Forte	Fraco	Pele+TGI
Pacientes	Pré-TCTH	Dia da DECH	Pré-TCTH	Dia da DECH	
30	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	-
57	Fraco	Fraco	Médio	Médio	-
62	Fraco	Médio	Fraco	Médio	-
63	Fraco	Médio	Fraco	Médio	-
67	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	-
71	Médio	Médio	Médio	Médio	-
76	Médio	Médio	Forte	Forte	-
81	Médio	Médio	Médio	Médio	-

Legenda: pré-TCTH: pré transplante de células-tronco hematopoéticas; TGI: trato gastro-intestinal; S/M: sem marcação



Da mesma forma que as citocinas, as quimiocinas parecem estar associadas à patogênia da DECHa. Portanto, nossa segunda análise foi verificar o papel das quimiocinas no aparecimento da DECHa.

### **3. *Análise das quimiocinas como biomarcadores da DECH aguda.***

#### **3.1. *Quimiocinas no plasma:***

As quimiocinas pertencem a uma grande família de proteínas com cerca de 8-12kD, que tem como a função primária serem moléculas quimioatratantes de leucócitos. Estas proteínas têm funções adicionais em processos como angiogênese, hematopoese e ativação de células do sistema imune. Como discutido na introdução, várias quimiocinas estão ligadas a patogênese da DECHa, conforme estudos em modelos animais. No entanto, em humanos, poucos trabalhos vêm relacionando quimiocinas e o aparecimento da DECHa.

Sendo assim, nós decidimos estudar estas moléculas no plasma e pele dos pacientes submetidos ao TCTHs, da mesma forma que as citocinas. Para a avaliação das quimiocinas no plasma, nós utilizamos o Kit CBA de quimiocinas humanas (BD), que avalia simultaneamente as quimiocinas CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES) e CCL2 (MCP-1). Nós acompanhamos estes pacientes do D-8 ao D+100, conforme a figura 17.

Nós não conseguimos avaliar a concentração de RANTES por causa da sensibilidade do Kit. Como podemos observar, nós tivemos um aumento na concentração de IP-10 e MCP-1 no D+14 quando comparados com o D-8. MIG variou muito durante o acompanhamento e IL-8 teve um aumento elevado no D+100, sugerindo uma possível relação com a DECHc.

#### **3.2. *Análise da relação entre o aumento das concentrações de quimiocinas e o risco de desenvolver DECHa.***

Da mesma forma que as citocinas, nos avaliamos estas moléculas separando em dois grupos: os pacientes que desenvolveram a doença e os pacientes que não desenvolveram a doença.

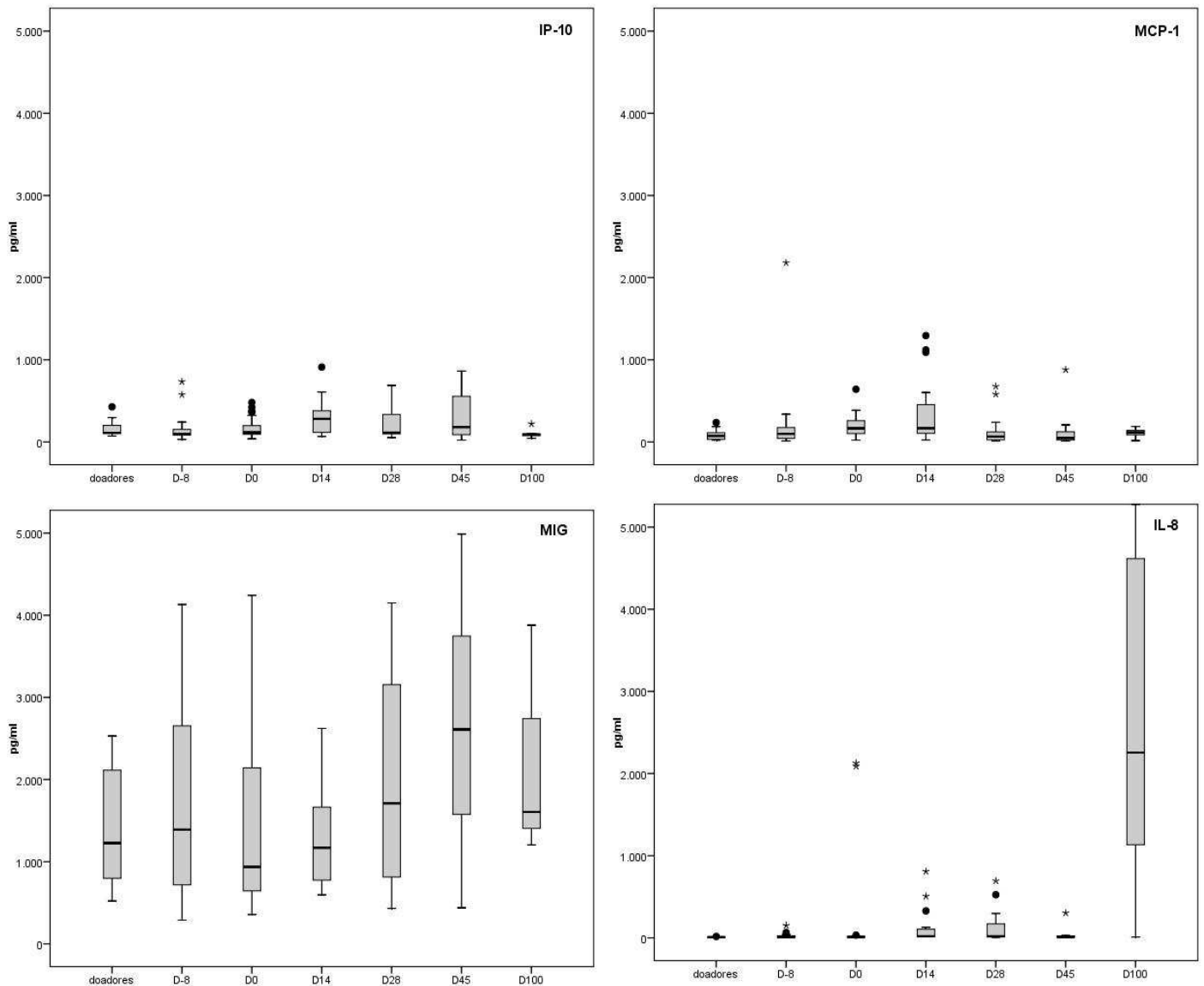
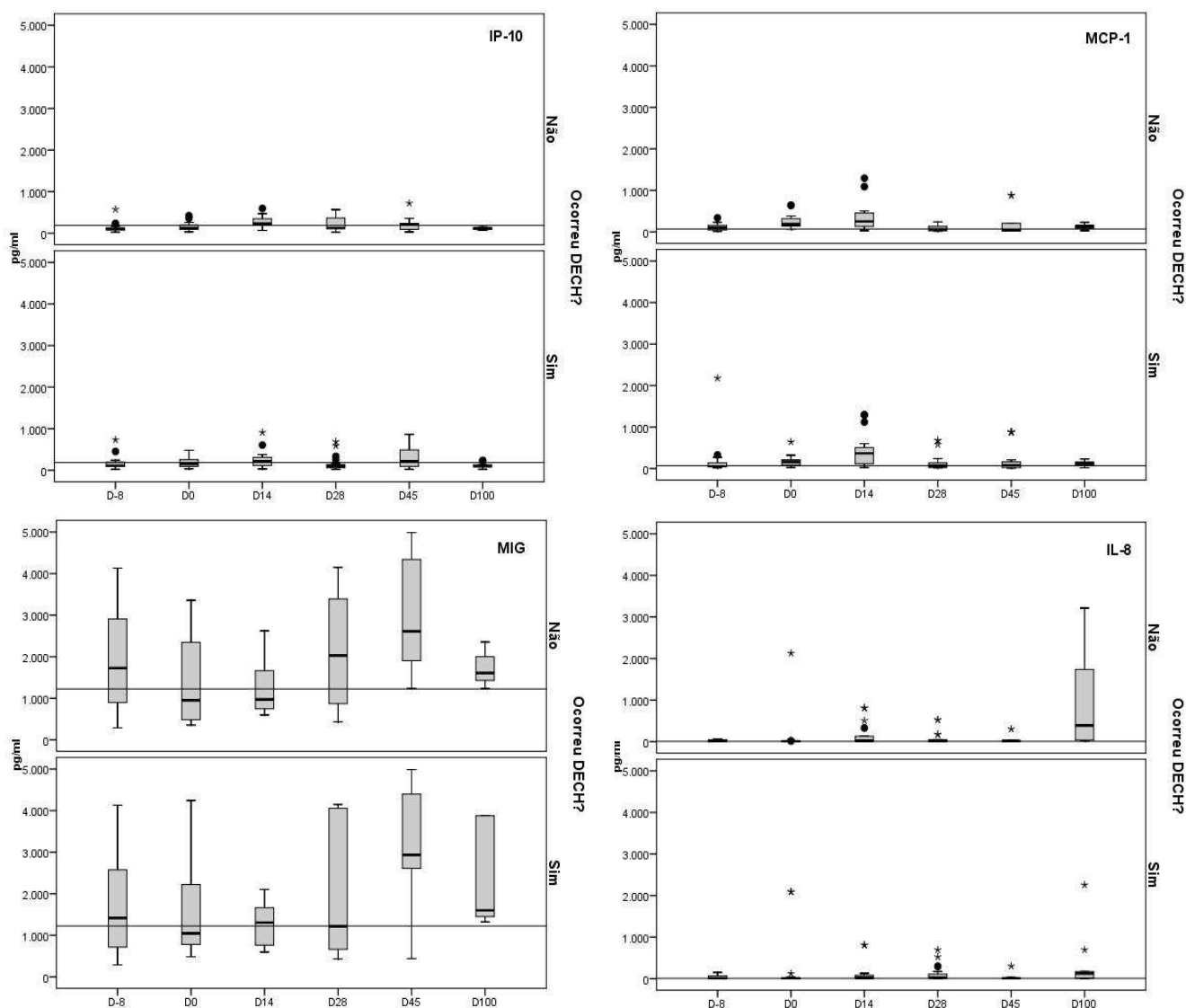


Figura 17 - Distribuição dos níveis séricos de algumas quimiocinas de acordo com os diferentes dias de acompanhamento.



**Figura 18 - Distribuição dos níveis séricos de algumas quimiocinas nos diferentes dias, de acordo com o aparecimento ou não de DECHa. A linha no gráfico indica a mediana de quimiocinas obtidas de doadores saudáveis.**

Como podemos observar, ao separar as quimiocinas de acordo com o acometimento ou não da doença, os pacientes que apresentaram DECHa não apresentaram muita diferença quando comparados com os pacientes que não apresentaram a doença, com exceção de MIG e IL-8. MIG apresentou um pequeno aumento no D+14 nos pacientes que apresentaram DECHa quando comparados com os pacientes que não apresentaram a doença. Já IL-8 aumentou no D+100, mas em pacientes que não apresentaram DECHa. Isto ainda pode significar uma correlação com

DECHc, porém não temos dados para confirmar, uma vez que nossa abordagem foi somente com a DECHa.

Para tentar elucidar a significância do aumento destas quimiocinas no aparecimento da DECHa, nos categorizamos as quimiocinas no D+14, D+28 e D+45 da mesma forma que fizemos com as citocinas, ou seja, estabelecemos como ponto de corte a mediana encontrada nos pacientes no D-8. Assim, conseguimos calcular a chance de risco dos pacientes desenvolverem DECHa de acordo com o aumento destas quimiocinas (tabela X).

**Tabela X - Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das quimiocinas nos diferentes dias.**

	D+14		D+28		D+45	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<b>IP-10</b>	1,02 (0,18-5,66)	0,660	1,00 (0,19-5,00)	0,660	0,50 (0,09-2,72)	0,352
<b>MCP-1</b>	0,58 (0,11-2,88)	0,396	1,00 (0,14-6,85)	0,695	1,00 (0,08-11,93)	0,748
<b>MIG</b>	0,84 (0,18-3,88)	0,564	3,00 (0,45-19,59)	0,234	1,63 (0,13-19,38)	0,592
<b>IL-8</b>	0,30 (0,05-1,58)	0,149	0,36 (0,06-1,96)	0,221	1,12 (0,18-6,93)	0,627

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas quando categorizamos estas quimiocinas de acordo com o aumento delas acima da mediana estabelecida. O aumento de MCP-1, MIG e IL-8 no D+14, na verdade, conferiram proteção para o aparecimento da DECHa, porém sem significância estatística.

### **3.3. Análise da relação entre o aumento das concentrações das quimiocinas e o risco de desenvolver DECHa nos diferentes órgãos-alvo da doença.**

Da mesma forma que fizemos com as citocinas, nós dividimos os pacientes de acordo com o órgão acometido pela doença. Nós calculamos o odds ratio para cada quimiocina nos dias D+14, D+28 e D+45, relacionando o aumento ou a diminuição destas moléculas de acordo com o órgão afetado, conforme mostrado na tabela XI.

**Tabela XI – Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento dos níveis séricos das quimiocinas nos diferentes dias, separado por órgão acometido pela DECHa.**

		D+14		D+28		D+45	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
IP-10	DECHa pele	0,51 (0,04-5,60)	0,515	1,96 (0,20-18,72)	0,486	2,90 (0,23-36,16)	0,397
	DECHa fígado	0,50 (0,06-3,64)	0,421	0,31 (0,03-2,90)	0,279	1,17 (0,16-8,33)	0,632
	DECHa TGI	0,22 (0,04-1,08)	0,050	0,60 (0,12-2,94)	0,408	0,43 (0,09-1,91)	0,231
MCP-1	DECHa pele	2,83 (0,32-24,80)	0,337	1,90 (0,19-18,69)	0,502	1,90 (0,19-18,92)	0,506
	DECHa fígado	1,31 (0,11-14,92)	0,662	0,52 (0,05-5,12)	0,502	0,95 (0,15-5,86)	0,670
	DECHa TGI	1,11 (0,21-5,80)	0,615	0,86 (0,17-4,17)	0,585	1,07 (0,23-4,91)	0,618
MIG	DECHa pele	0,21 (0,03-1,41)	0,126	Não estimado	0,030	1,91 (0,15-23,64)	0,524
	DECHa fígado	Não estimado	0,236	0,53 (0,07-3,72)	0,437	0,95 (0,08-10,48)	0,687
	DECHa TGI	0,85 (0,17-4,18)	0,582	0,98 (0,24-3,95)	0,630	1,75 (0,24-12,27)	0,467
IL-8	DECHa pele	0,20 (0,02-2,05)	0,168	0,52 (0,07-3,56)	0,424	0,08 (0,00-1,23)	0,098
	DECHa fígado	3,07 (0,51-18,53)	0,200	2,70 (0,63-11,45)	0,155	0,93 (0,08-10,89)	0,729
	DECHa TGI	6,50 (1,60-26,36)	0,007	0,63 (0,16-2,39)	0,368	4,44 (0,41-47,50)	0,215

Nós encontramos diferenças estatisticamente significativas para DECHa de TGI para as quimiocinas IP-10 e IL-8. O aumento de IP-10 acima do ponto de corte de 150 pg/ml conferiu proteção para o aparecimento de DECHa de TGI no D+14 [0,22 (0,04-1,08),  $p=0,050$ ]. Já a IL-8 aumentada acima do ponto de corte de 26 pg/ml no D+14 conferiu um risco de 6,5 vezes a mais de desenvolver DECHa de TGI do que os pacientes que não apresentaram níveis elevados desta quimiocina [6,50 (1,60-26,36),  $p=0,007$ ]. Nós observamos também uma significância para o aumento de MIG no D+28 e DECHa de pele ( $p=0,030$ ), porém não conseguimos estimar o OR.

Uma vez que estamos em busca de moléculas que possam predizer o aparecimento de DECHa, da mesma forma que fizemos com as citocinas, nós resolvemos concentrar as nossas análises no D+14, porém para todas as quimiocinas estudadas.

#### **3.4. Correlação do aumento dos níveis séricos de algumas quimiocinas com as diferentes variáveis clínicas e biológicas.**

Da mesma forma que fizemos com as citocinas, realizamos uma análise multivariada por regressão logística. Em um estudo de correlação das quimiocinas estudadas no D+14 com diversas variáveis clínicas-biológicas (compatibilidade HLA, idade, sexo, origem das células-tronco, relação dos doadores, regime de

condicionamento, estado da doença de base), descobrimos que estas quimiocinas são independentes dessas variáveis, com exceção do regime de condicionamento.

Nos pacientes que receberam condicionamento mieloablativo, o aumento de MCP-1 acima do ponto de corte de 175 pg/ml no D+14 em pacientes com DECHa teve significância estatística quando comparados com pacientes que não desenvolveram DECHa, mas receberam o mesmo tipo de condicionamento [OR = 4,78 (1,12 – 20,31),  $p = 0,032$ ]. Não foi observada significância estatística para o regime de intensidade reduzida, como mostra a tabela XII.

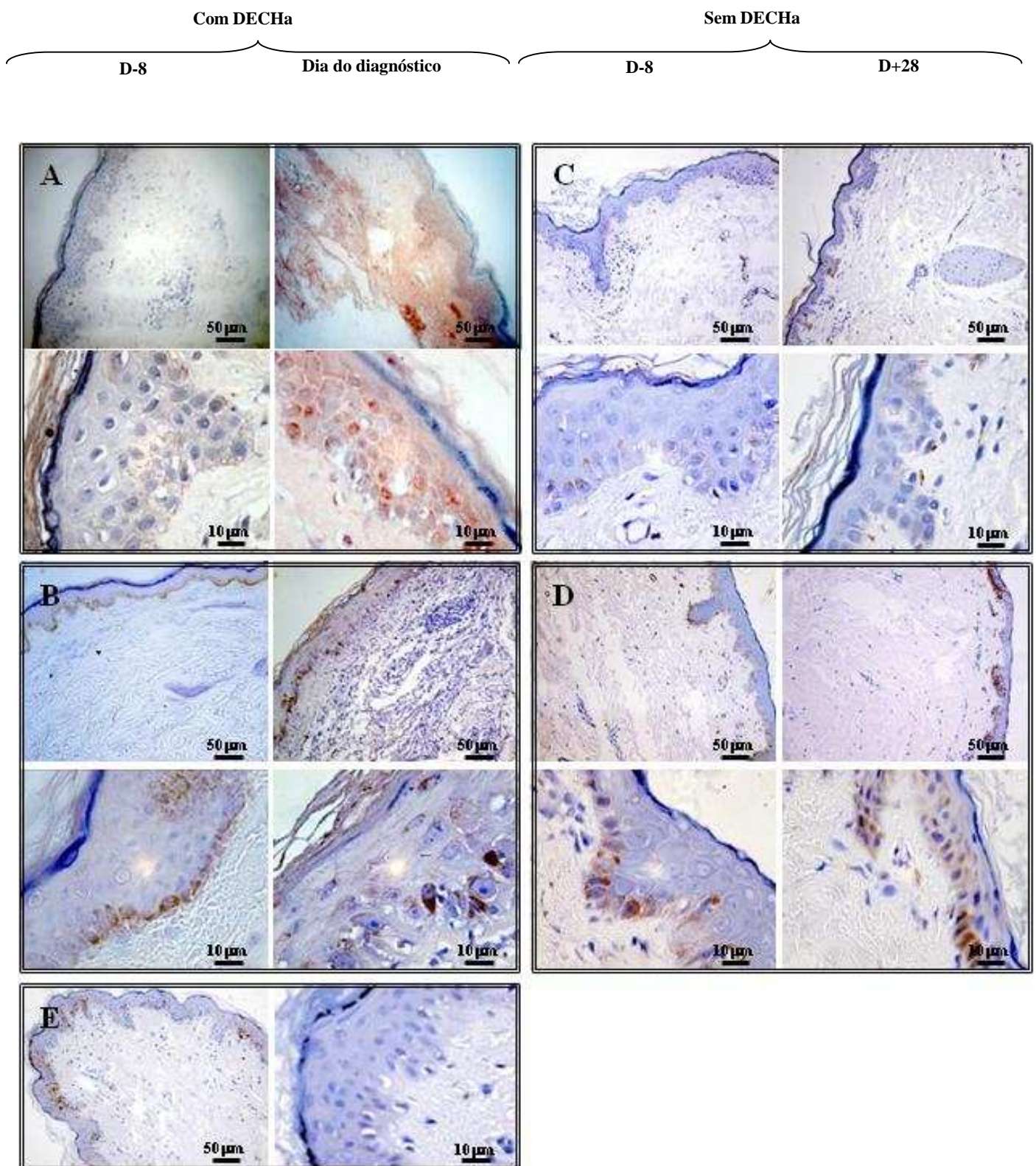
**Tabela XII – Relação entre MCP-1 e regime de condicionamento.**

		<b>OR MCP-1 no D+14</b>	<b><i>p</i></b>
		<b>(95%CI)</b>	
Regime de condicionamento	Mieloablativo	4,78 (1,12 – 20,31)	0,032
	Intensidade reduzida	0,01 (0,00-1,34)	0,121

### **3.5. *Análise de algumas quimiocinas em biópsias de pele.***

Além de utilizar o Kit CBA para medir a concentração de quimiocinas plasmáticas, verificamos também a distribuição de algumas destas quimiocinas e seus receptores em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram a DECH aguda. Essas quimiocinas foram escolhidas de acordo com dados obtidos da literatura.

Nós analisamos a expressão de IP-10 e de seu receptor CXCR3 em biópsias de pele de pacientes submetidos ao transplante antes do regime de condicionamento (D-8) e no diagnóstico de DECHa. Além disso, também comparamos com as expressões de IP-10 e CXCR-3 com biópsias de pele do dia D-8 e D+28 em pacientes que não desenvolveram DECH aguda.



**Figura 19 - Padrão da expressão do receptor de quimiocina CXCR3 em biópsias de pele.** As análises das biópsias de pele foram realizadas em pacientes com DECHa (A – paciente 1; B – paciente 43) nos dias -8, +14 e no dia do diagnóstico da doença, e sem DECHa (C – paciente 6; D – paciente 71) nos dias -8, +14 e +28. Essas biópsias foram comparadas com biópsias de pele de indivíduos saudáveis (E).

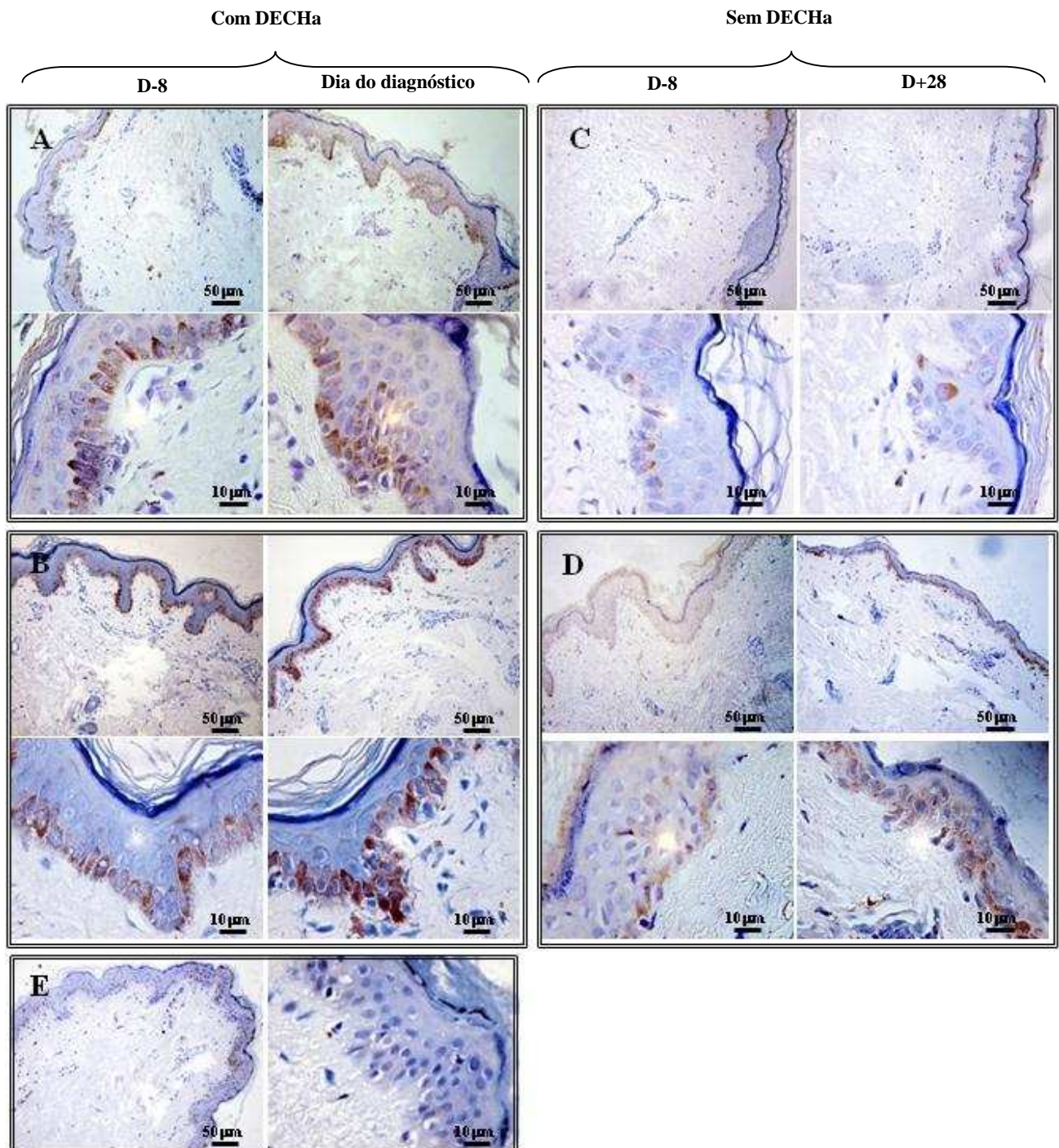
A Figura 19 mostra os padrões de CXCR3 encontrados nos pacientes estudados. Foram analisadas 29 biópsias de pacientes (7 sem DECHa e 24 com DECHa), e foi observado que todos os pacientes que apresentaram DECHa já possuíam sinais da expressão de CXCR3 na pele no pré-transplante (A e B, D-8), quando comparado com amostras de pele de doadores saudáveis (Figura 19E). Já os pacientes que não apresentaram DECHa, alguns possuíam expressão de CXCR3 no pré-transplante, enquanto outros não tinham a expressão desta molécula no D-8. Durante o acompanhamento, há um aumento na intensidade de coloração no dia do diagnóstico da doença nos pacientes que desenvolveram DECHa. Porém, no D+28 de pacientes sem DECHa, da mesma forma que o encontrado no D-8, alguns pacientes apresentavam marcação, enquanto outros pacientes não apresentavam marcação alguma para CXCR3. Estes resultados indicam que CXCR3 está aumentado em pacientes com DECHa, porém, pacientes que não apresentaram a doença também possuem marcação para a doença, indicando que este tipo de análise não pode ser utilizado como um marcador da DECHa.

Apesar de não termos encontrados diferenças estatisticamente significativas na análise do plasma para DECHa de pele, nós também analisamos a quimiocina IP-10 nas biópsias de pele destes pacientes, conforme podemos ver na figura 20.

Observando a figura 20, podemos ver o mesmo padrão de marcação que obtivemos para CXCR3, ou seja, pacientes que tiveram DECHa apresentaram marcação antes mesmo do transplante, enquanto pacientes que não apresentaram DECHa, alguns possuíam marcação, enquanto outros não. Apesar disso, nós conseguimos observar em alguns pacientes que desenvolveram a doença um discreto aumento na intensidade de coloração, enquanto outros tiveram diminuição da marcação entre o pré-transplante e o dia do diagnóstico da doença.

A partir da análise das imunohistoquímicas, tentamos estabelecer um padrão para a expressão de CXCR3 e IP-10 em pacientes que desenvolveram ou não a doença, da mesma forma que fizemos com as análises de citocinas na pele destes pacientes. Nós categorizamos as moléculas estudadas de acordo com a intensidade de coloração, conforme a tabela XIII.



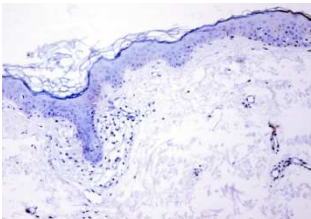
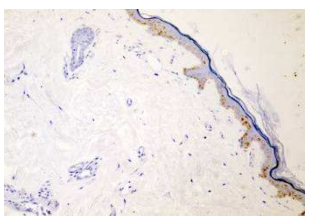
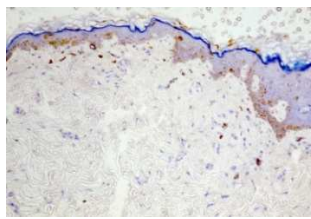
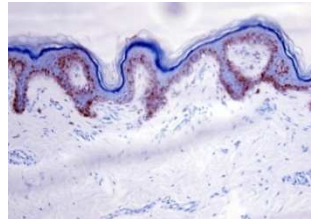
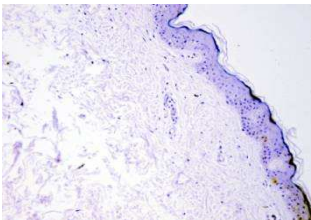
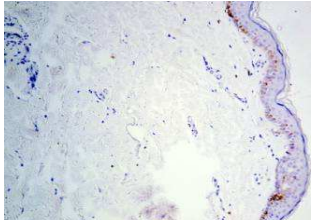
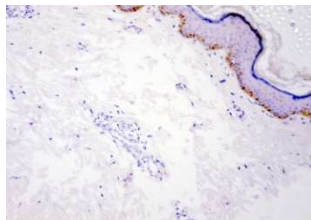
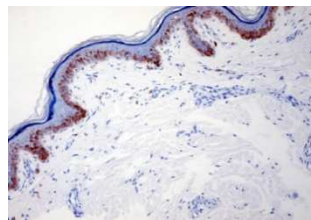


**Figura 20 – Padrão da expressão da quimiocina IP-10 em biópsias de pele.** As análises das biópsias de pele foram realizadas em pacientes com DECHa (A – paciente 54; B – paciente 47) nos dias –8, +14 e no dia do diagnóstico da doença, e sem DECHa (C – paciente 6; D – paciente 71) nos dias –8, +14 e +28. Essas biópsias foram comparadas com biópsias de pele de indivíduos saudáveis (E).

Nós analisamos os pacientes que apresentaram a doença, no pré transplante e no dia do diagnóstico da doença. Já os pacientes que não desenvolveram DECHa foram analisados no D-8 e no D+28. Analisamos a expressão destas moléculas em 24 pacientes

com DECHa. Para CXCR3, 12 pacientes mantiveram a mesma expressão no D-8 e no dia do diagnóstico da doença, 7 pacientes tiveram um aumento na expressão desta molécula no dia do diagnóstico da doença, 1 paciente não apresentou marcação e 4 pacientes diminuíram a expressão de CXCR3 no dia do diagnóstico quando comparados com o D-8. Já para a expressão de IP-10, 12 pacientes mantiveram a mesma intensidade de coloração do D-8, 4 pacientes tiveram aumento na expressão de IP-10 no pós-transplante, 4 pacientes não apresentaram marcação e 4 pacientes diminuíram a expressão de IP-10 no dia do diagnóstico da DECHa quando comparados com o D-8.

**Tabela XIII – Graduação da intensidade de coloração obtida nas imunohistoquímicas para IP-10 e CXCR-3 nas biópsias de pele dos pacientes submetidos ao TCTH.**

	Sem marcação	Marcação fraca	Marcação média	Marcação forte
<b>CXCR-3</b>				
<b>IP-10</b>				

Dos pacientes que não desenvolveram a doença (no total, 7 foram analisados), a maioria dos casos apresentou uma diminuição da intensidade de marcação do D-8 para o D+28, tanto para CXCR3, como para o IP-10. Apenas 1 paciente teve um aumento na expressão destas moléculas (de fraca para média). Estes resultados estão na tabela XIV.

Portanto, nossos resultados demonstram que algumas quimiocinas são importantes para o estabelecimento da DECHa. Nós observamos que o aumento da concentração plasmática de IP-10 confere proteção para DECHa de TGI, enquanto o aumento da concentração plasmática de IL-8 no D+14 aumenta o risco de desenvolver DECHa de TGI. Vimos também que o aumento da concentração plasmática de MIG no D+28 aumenta o risco de desenvolver DECHa de pele. Já o aumento da concentração plasmática de MCP-1 no D+14 está relacionado com um maior risco de desenvolver

DECHa em pacientes que receberam condicionamento mieloablativo. E, por fim, a expressão de IP-10 e CXCR-3 em biópsias de pele não podem ser utilizadas como preditores ou marcadores da DECHa, uma vez que foi observada uma grande variação entre os pacientes analisados.

**Tabela XIV – Padrão de expressão das moléculas CXCR3 e IP-10 em biópsias de pele de pacientes que desenvolveram ou não DECHa.**

c/DECHa	CXCR-3		IP-10		Órgão acometido
	Pré-TCTH	Dia da DECH	Pré-TCTH	Dia da DECH	
1	Fraco	Forte	S/M	S/M	Pele
4	Médio	Médio	S/M	S/M	Pele
6	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	TGI
11	Médio	Médio	S/M	S/M	Pele
12	Fraco	Fraco	Médio	Médio	Pele
13	S/M	S/M	S/M	S/M	Pele
14	Fraco	Fraco	Fraco	Forte	Pele
17	Médio	Médio	Médio	Médio	Pele
21	Médio	Médio	Forte	Médio	Pele
27	Médio	Médio	Médio	Médio	Pele
31	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Pele
32	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Pele+TGI
39	Médio	Forte	Forte	Forte	Pele+TGI
40	Forte	Forte	Forte	Forte	Pele+TGI+fígado
43	Médio	Forte	Fraco	Fraco	Pele
44	Forte	Médio	Médio	Médio	Pele
47	Forte	Forte	Forte	Forte	Pele
51	Fraco	Forte	Fraco	Médio	Pele+TGI
54	Fraco	Médio	Médio	Forte	Pele+TGI+fígado
59	Fraco	Forte	Médio	Médio	Pele+TGI+fígado
60	Médio	Fraco	Forte	Médio	Pele
61	Médio	Fraco	Forte	Médio	Pele+TGI
75	Fraco	Médio	Fraco	Médio	Pele+TGI
77	Forte	Fraco	Forte	Fraco	Pele+TGI
s/DECHa	Pré-TCTH	D+28	Pré-TCTH	D+28	
57	Fraco	Médio	Fraco	Médio	-
62	Médio	Médio	Forte	Forte	-
63	Forte	Médio	Médio	Médio	-
67	Forte	Médio	Forte	Médio	-
71	Fraco	Forte	Forte	Forte	-
76	Forte	Forte	Forte	Forte	-
81	Médio	Médio	Forte	Médio	-

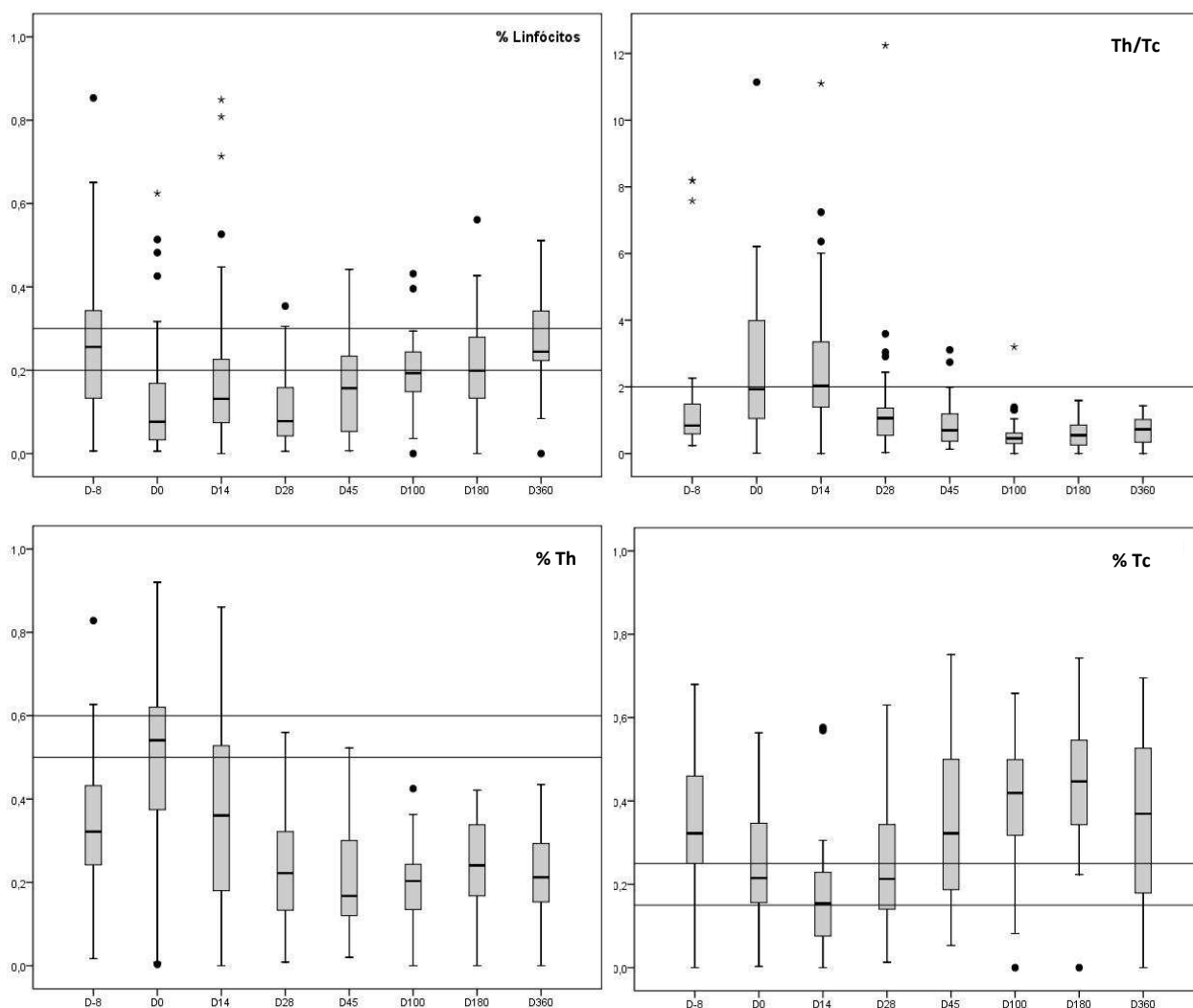
Legenda: pré-TCTH: pré transplante de células-tronco hematopoéticas; TGI: trato gastro-intestinal; S/M: sem marcação

Outro aspecto importante para o estabelecimento da DECHa é o envolvimento de diversas populações celulares sanguíneas, tais como linfócitos T, células NK, APCs, entre outras. Portanto, o próximo passo deste estudo foi analisar as diferentes populações celulares e verificar o seu envolvimento no surgimento da DECHa.

#### 4. Análise das populações celulares no sangue periférico pós TCTH e seu envolvimento na DECH aguda.

##### 4.1. Recuperação imunológica

O sangue periférico dos pacientes submetidos ao transplante foi analisado também de acordo com o perfil das populações celulares presentes. Em sangue periférico de doadores normais podemos encontrar entre 20 e 40 % de linfócitos, sendo a quantidade de células T dentro da população de linfócitos cerca de 70%. Nesta população, a relação  $T\ CD4^+/T\ CD8^+$  é de 2/1, ou seja, normalmente encontramos duas vezes mais células  $T\ CD4^+$  (Th) do que células  $T\ CD8^+$  (Tc). A figura 21 mostra o perfil dessas populações nos pacientes nos diferentes dias de tratamento.



**Figura 21 – Percentual de linfócitos Th e Tc no acompanhamento pós TCTH.** As linhas representam o mínimo e máximo encontrado em sangue periférico de pessoas saudáveis.

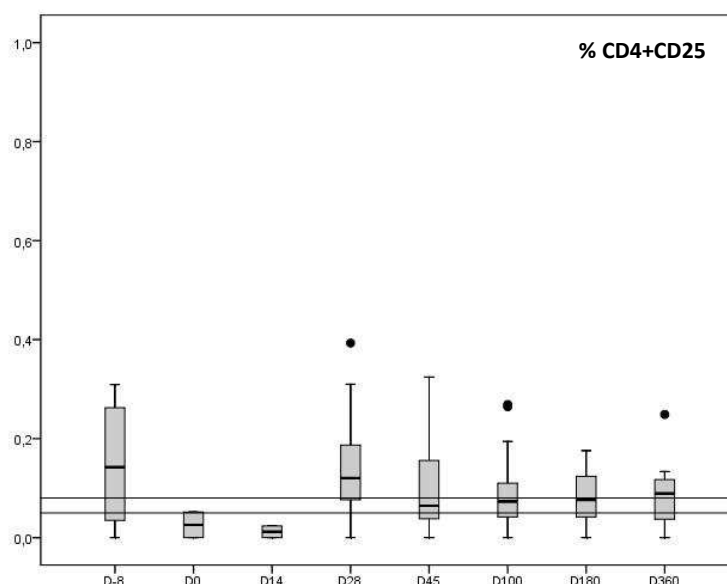
A porcentagem de linfócitos totais em nossos pacientes varia de acordo com o tratamento. Isso se deve ao condicionamento, que leva à uma depleção da medula óssea. Por isso, é normal encontrarmos no D0 uma porcentagem de linfócitos baixa. Dependendo do condicionamento, mieloablativo ou de intensidade reduzida, nós podemos ter uma quantidade relativa de linfócitos e das outras populações celulares no D0.

Agora, a razão de células T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> (Th/Tc) na população estudada se inverte quando comparado com doadores saudáveis, uma vez que a quantidade de células Th diminui consideravelmente e a de células Tc aumenta. Isso corrobora com os dados da literatura (Roux *et al.*, 1996), que diz que a razão Th/Tc em pacientes transplantados fica invertida por vários anos após o transplante. Neste trabalho, os autores sugerem que isso ocorra devido à multiplicação das células T CD8<sup>+</sup> dos doadores que foram injetadas nos pacientes, promovendo a inversão desta taxa (0,5 +/- 1,0, em média). Taxas semelhantes foram encontradas em nossos pacientes, uma vez que até 100 dias pós-transplante, a média obtida entre os pacientes analisados fica em 1,23, e no D+360, fica em 0,26.

As células T regulatórias foram descritas em 1972 por Gershon e colaboradores, e é uma população que expressa CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e FOXP3, e possui a capacidade de regular a proliferação de células T e a sua expansão em resposta a antígenos, podendo modular a ocorrência e gravidade da DECH em modelos animais. Em pessoas saudáveis, a quantidade de células T regulatórias representa cerca de 5% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Nós analisamos a ocorrência da subpopulação CD4<sup>+</sup>+CD25<sup>+</sup> em nossos pacientes, representado na figura 22. Nesta subpopulação está inserida a população de células T regulatórias.

Como podemos ver, ocorre uma queda na mediana desta população no D0 e no D+14, o que ocorre por conta dos regimes de condicionamento. Porém, no D+28 esta população está acima dos níveis normalmente encontrados. Do D+45 em diante, os níveis desta população já se encontra normalizada até o fim de um ano. Portanto, se as células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> tem algum papel na DECHa, isto ocorre entre os dias 0 e 45.

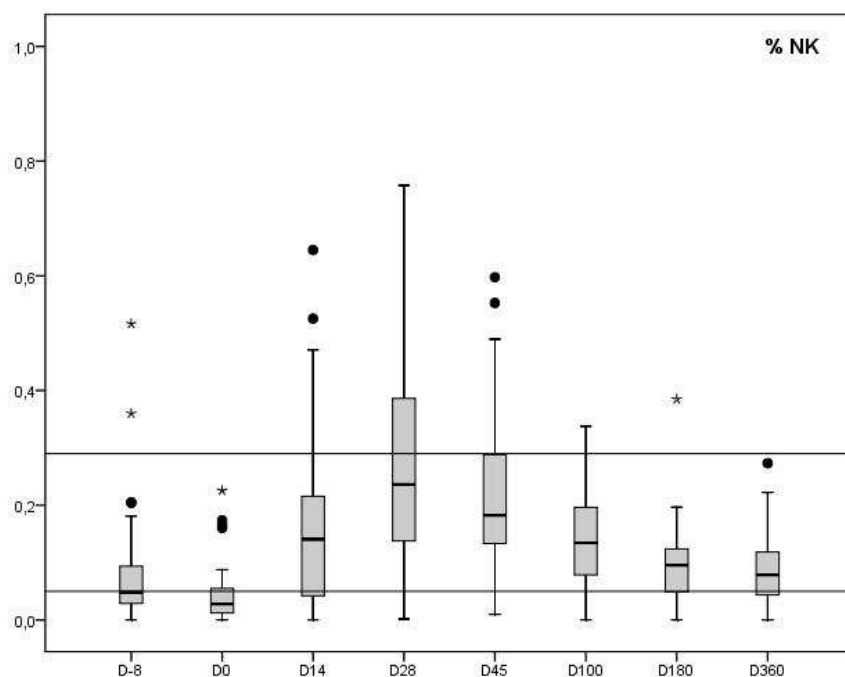




**Figura 22 – Percentual de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH.** As linhas representam o mínimo e máximo encontrado em sangue periférico de pessoas saudáveis.

As células NK também foram analisadas neste estudo. As células NK (do inglês Natural Killer Cell) são um tipo de linfócito, pertencentes ao ramo inato do sistema imunológico. Têm um papel importante no combate a infecções virais e células tumorais. Identificadas pela primeira vez em 1975, foram rotuladas de Exterminadoras Naturais (Natural Killer), pela sua atividade citotóxica contra células tumorais de diferentes linhagens, sem a necessidade de reconhecimento prévio de um antígeno específico, contrariamente ao funcionamento dos linfócitos T (Kieślinski *et al.*, 1975). A quantidade de células NK em pessoas saudáveis varia entre 5 e 30%. A figura 23 mostra os valores encontrados durante o acompanhamento dos pacientes pós-transplante.

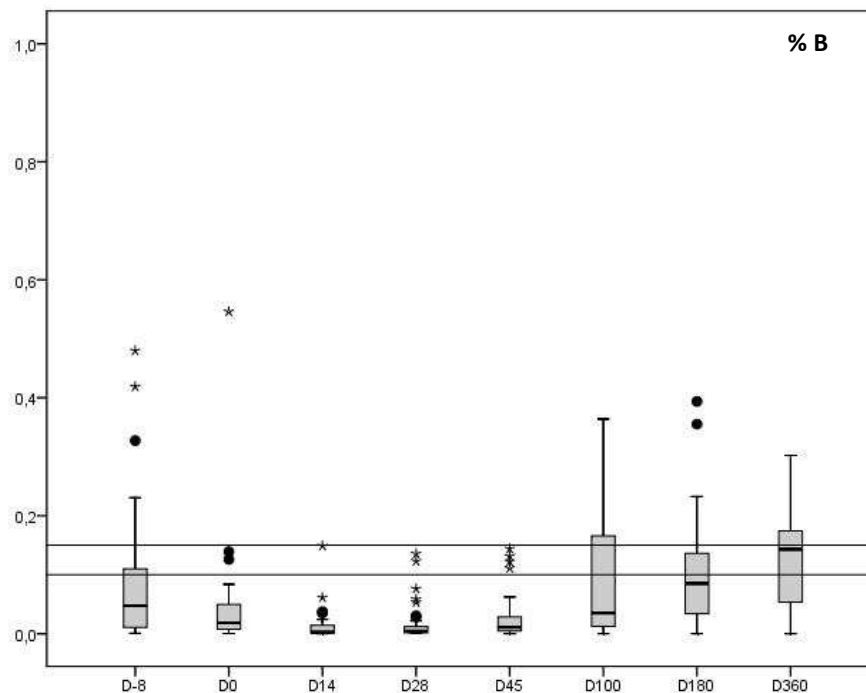
Como podemos observar, houve uma queda do pré-transplante até o D0, porém um rápido aumento destas células já no D+14. Apesar desta variação, a quantidade de células NK encontrada nestes pacientes foi dentro da faixa esperada em pessoas saudáveis.



**Figura 23 - Percentual de células NK em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH** As linhas representam o mínimo e máximo encontrado em sangue periférico de pessoas saudáveis.

A célula B tem um importante papel na imunidade humoral e é um essencial componente do sistema imune adaptativo. A principal função das células B é a produção de anticorpos contra antígenos. Após sua ativação os linfócitos B podem sofrer diferenciação em plasmócitos ou células B de memória. Nós também investigamos a quantidade de células B durante o acompanhamento dos pacientes submetidos ao transplante. A quantidade normal de células B encontrada em sangue periférico de pessoas saudáveis varia de 10 a 15% dos linfócitos totais. A figura 24 mostra os valores encontrados durante o acompanhamento dos pacientes pós-transplante.

Como podemos ver, há uma queda acentuada do número de linfócitos B no sangue periférico de pacientes submetidos ao transplante logo após o condicionamento. Porém, a porcentagem de células B nestes pacientes já encontra-se diminuída no pré-transplante. O aumento ocorre após ao D+100, se normalizando cerca de 6 meses pós-transplante.



**Figura 24 - Percentual de células B em sangue periférico de pacientes submetidos ao TCTH.** As linhas representam o mínimo e máximo encontrado em sangue periférico de pessoas saudáveis.

#### 4.2. Associação entre a razão de células NK e células B e a ocorrência de DECHa.

Durante o acompanhamento da recuperação imunológica, observamos que ocorreu um aumento na mediana das células NK entre os dias 0 e 45. Além disso, nestes mesmos dias observamos uma diminuição na mediana das células B. Sendo assim, nós calculamos a relação NK/B nos dias +14, +28 e +45 entre os pacientes que tiveram DECHa e os pacientes que não desenvolveram a doença, conforme mostra a tabela XV.

**Tabela XV – Relação de células NK/células B**

		D+14	D+28	D+45
DECHa	Não	15,71	10,66	3,88
	Sim	10,61	13,94	17,30

Os pacientes que não desenvolveram DECHa tiveram esta relação diminuída no decorrer do acompanhamento. Já os pacientes que desenvolveram DECHa tiveram



aumento nesta relação, sugerindo uma relação entre a razão de células NK e as células B e o surgimento da DECHa.

#### **4.3. Populações celulares como marcadoras de DECHa**

A fim de verificar se uma das populações estudadas poderia ser utilizada como marcadora da DECHa, nós categorizamos as diferentes populações celulares no D+14, D+28 e D+45 da mesma forma que fizemos com as citocinas e quimiocinas, ou seja, estabelecemos como ponto de corte a mediana encontrada nos pacientes no D-8. Assim, conseguimos calcular a chance de risco dos pacientes desenvolverem DECHa de acordo com a variação destas populações celulares. Nós encontramos diferenças estatisticamente significativas com o aumento de células B, células NK e na razão células NK/B no D+14. O aumento destas populações acima do ponto de corte no D+14 aumenta o risco do aparecimento de DECH. Entretanto, no D+45, a diminuição das células B e aumento da razão NK/B aumenta o risco de DECHa.

**Tabela XVI - Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento das populações celulares nos diferentes dias.**

	<b>D+14</b>		<b>D+28</b>		<b>D+45</b>	
	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
<b>Th</b>	0,71 (0,19-2,72)	0,447	2,36 (0,64-8,60)	0,154	2,84 (0,52-15,46)	0,195
<b>Tc</b>	1,04 (0,95-1,14)	0,579	0,80 (0,24-2,63)	0,476	0,57 (0,15-2,07)	0,299
<b>NK</b>	6,38 (1,60-25,61)	0,005	0,82 (0,27-2,41)	0,469	1,31 (0,45-3,81)	0,412
<b>B</b>	3,03 (0,94-9,69)	0,049	1,70 (0,16-17,64)	0,557	0,71 (0,14-0,35)	0,000
<b>CD4+25</b>	1,10 (0,24-4,85)	0,602	1,03 (0,21-5,07)	0,647	1,21 (0,28-5,23)	0,540
<b>Th/Tc</b>	1,21 (0,28-5,23)	0,540	1,00 (0,25-3,94)	0,623	3,18 (0,33-30,16)	0,287
<b>NK/B</b>	3,90 (1,23-12,30)	0,018	0,70 (0,58-1,07)	0,170	4,84 (1,08-21,75)	0,033

Nós também investigamos as populações celulares de acordo com o órgão afetado pela DECHa. De acordo com a tabela XVII, apesar de todas as variações encontradas, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na análise por órgão.

**Tabela XVII - Chance de risco para ocorrência de DECHa, de acordo com o aumento das populações celulares nos diferentes dias e com o órgão afetado pela DECHa.**

		D+14		D+28		D+45	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Th	DECHa pele	0,77 (0,06 – 9,88)	0,677	0,22 (0,03 – 1,46)	0,120	0,65 (0,08 – 4,83)	0,527
	DECHa fígado	0,57 (0,06 – 4,87)	0,504	0,28 (0,02 – 2,74)	0,257	0,66 (0,05 – 7,47)	0,615
	DECHa TGI	1,00 (0,20 – 4,85)	0,656	0,80 (0,20 – 3,21)	0,518	0,72 (0,14 – 3,54)	0,500
Tc	DECHa pele	1,05 (0,95 – 1,16)	0,909	0,84 (0,12 – 5,56)	0,605	4,40 (0,41 – 46,26)	0,213
	DECHa fígado	0,94 (0,85 – 1,05)	0,864	1,18 (0,18 – 7,84)	0,605	0,33 (0,03 – 3,72)	0,359
	DECHa TGI	0,90 (0,73 – 1,10)	0,455	1,79 (0,36 – 8,74)	0,371	0,39 (0,08 – 1,93)	0,224
NK	DECHa pele	1,57 (1,14 – 2,15)	0,296	1,20 (0,11 – 13,14)	0,647	1,15 (0,98 – 1,36)	0,526
	DECHa fígado	0,40 (0,04 – 3,52)	0,382	0,83 (0,07 – 9,12)	0,647	0,18 (0,01 – 2,99)	0,308
	DECHa TGI	4,28 (0,66 – 27,78)	0,125	0,94 (0,13 – 6,54)	0,672	2,00 (0,15 – 25,11)	0,529
B	DECHa pele	1,05 (0,94 – 1,18)	0,947	1,12 (0,98 – 1,28)	0,590	Não estimado	
	DECHa fígado	0,94 (0,83 – 1,06)	0,895	0,89 (0,78 – 1,01)	0,660	Não estimado	
	DECHa TGI	0,90 (0,73 – 1,10)	0,526	0,40 (0,03 – 4,99)	0,452	Não estimado	
CD4+25	DECHa pele	Não estimado		1,12 (0,15 – 8,20)	0,654	0,16 (0,02 – 1,35)	0,113
	DECHa fígado	Não estimado		0,27 (0,02 – 2,89)	0,274	0,83 (0,07 – 9,68)	0,693
	DECHa TGI	Não estimado		0,60 (0,12 – 2,97)	0,412	1,06 (0,18 – 6,21)	0,649
Th/Tc	DECHa pele	1,33 (1,05 – 1,68)	0,585	1,27 (0,12 – 13,35)	0,666	0,23 (0,02 – 2,06)	0,221
	DECHa fígado	0,73 (0,58 – 0,94)	0,438	0,60 (0,05 – 6,05)	0,562	1,58 (0,12 – 19,42)	0,583
	DECHa TGI	2,00 (0,29 – 13,51)	0,404	0,37 (0,07 – 1,92)	0,214	1,50 (0,20 – 10,80)	0,538
NK/B	DECHa pele	Não estimado		0,50 (0,49 – 5,15)	0,494	0,30 (0,02 – 3,13)	0,302
	DECHa fígado	Não estimado		1,42 (0,12 – 15,63)	0,632	1,42 (0,11 – 18,00)	0,643
	DECHa TGI	Não estimado		1,20 (0,26 – 5,36)	0,555	4,44 (0,83 – 23,58)	0,079

#### 4.4. Análise multivariada:

A fim de confirmarmos se os achados na análise univariada tinham relação com alguma variável clínica ou biológica, nos realizamos uma análise multivariada correlacionando a ocorrência de DECHa com o aumento ou diminuição de linfócitos B no D+45 e as diferentes variáveis clínicas. Nós não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de DECHa, linfócitos B e razão NK/B no D+45 e as diferentes variáveis clínicas ou biológicas.

Todas as análises anteriores foram realizadas de acordo com dados já existentes na literatura. Citocinas, quimiocinas, populações celulares e variáveis clínicas e biológicas como match de HLA, regime de condicionamento, parentesco do doador e idade do receptor já vêm sendo estudadas como importantes na DECHa no decorrer dos anos, com resultados bastante controversos. Entretanto, uma abordagem mais ampla de forma a escolher novos potenciais biomarcadores para a DECHa começou a ser utilizado recentemente. Porém, mesmo utilizando novas tecnologias para a descoberta de novas moléculas, muitos estudos ainda buscam estes marcadores dentro de um universo inflamatório.

Assim, a etapa a seguir deste estudo foi a procura de novas moléculas relacionadas com o aparecimento da DECHa, de forma a utilizá-las como potenciais biomarcadores. Para isto, utilizamos como ferramenta de estudo a tecnologia proteômica.

## **5. Análise proteômica das células mononucleares de sangue periférico de pacientes acompanhados no pós TCTH.**

O proteoma pode ser definido como o conjunto de proteínas expressa por um genoma e, portanto, representa toda a informação genética que está sendo expressa em um determinado momento ou condição patológica. Tendo em vista que o número estimado de transcritos que uma célula pode expressar é de 5000, e que somente a partir de modificações pós-traducionais podemos ter mais de 100.000 possíveis proteínas, fica evidente a potencialidade e a relevância de abordagens utilizando a tecnologia do proteoma para análises comparativas entre tipos celulares diferentes (Pizzatti *et al.*, 2006).

Portanto, neste trabalho nós iniciamos o estudo proteômico das células mononucleares de pacientes submetidos ao TCTH, com o objetivo de identificar alterações na expressão protéica durante o estabelecimento da DECHa que pudessem ser utilizadas para entender melhor este processo fisiopatológico e para identificar novas moléculas candidatas a biomarcadores. Para iniciarmos este estudo decidimos então analisar o perfil de células mononucleares de sangue periférico de 15 pacientes no dia do diagnóstico da DECHa e em outros dias em que foi possível obter material suficiente para análise.

### **5.1. Perfil protéico das células mononucleares dos pacientes acompanhados no pós TCTH.**

Dos 100 pacientes acompanhados por nós neste estudo, 15 que desenvolveram DECHa tiveram suas células mononucleares de sangue periférico analisadas em géis 2D. Nós obtivemos diferentes perfis entre pacientes, uma vez que estes possuem diversas variáveis diferentes entre si. As figuras 25, 26 e 27 mostram exemplos de perfis

protéicos das células mononucleares de pacientes com DECHa em momentos antes e após o diagnóstico da doença.

A figura 25 ilustra o perfil do paciente 52 antes do regime de condicionamento (D-8) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+28). Este paciente realizou transplante para tratamento de um Linfoma de Hodgkin e recebeu células-tronco originadas de sangue periférico mobilizado. Como podemos observar, o perfil protéico muda completamente do pré transplante para o dia do diagnóstico da DECHa; proteínas expressas no D-8 diminuem no D+28, assim como proteínas pouco expressas no D-8 aumentam a sua expressão no D+28. Além disso, diferenças qualitativas também podem ser visualizadas.

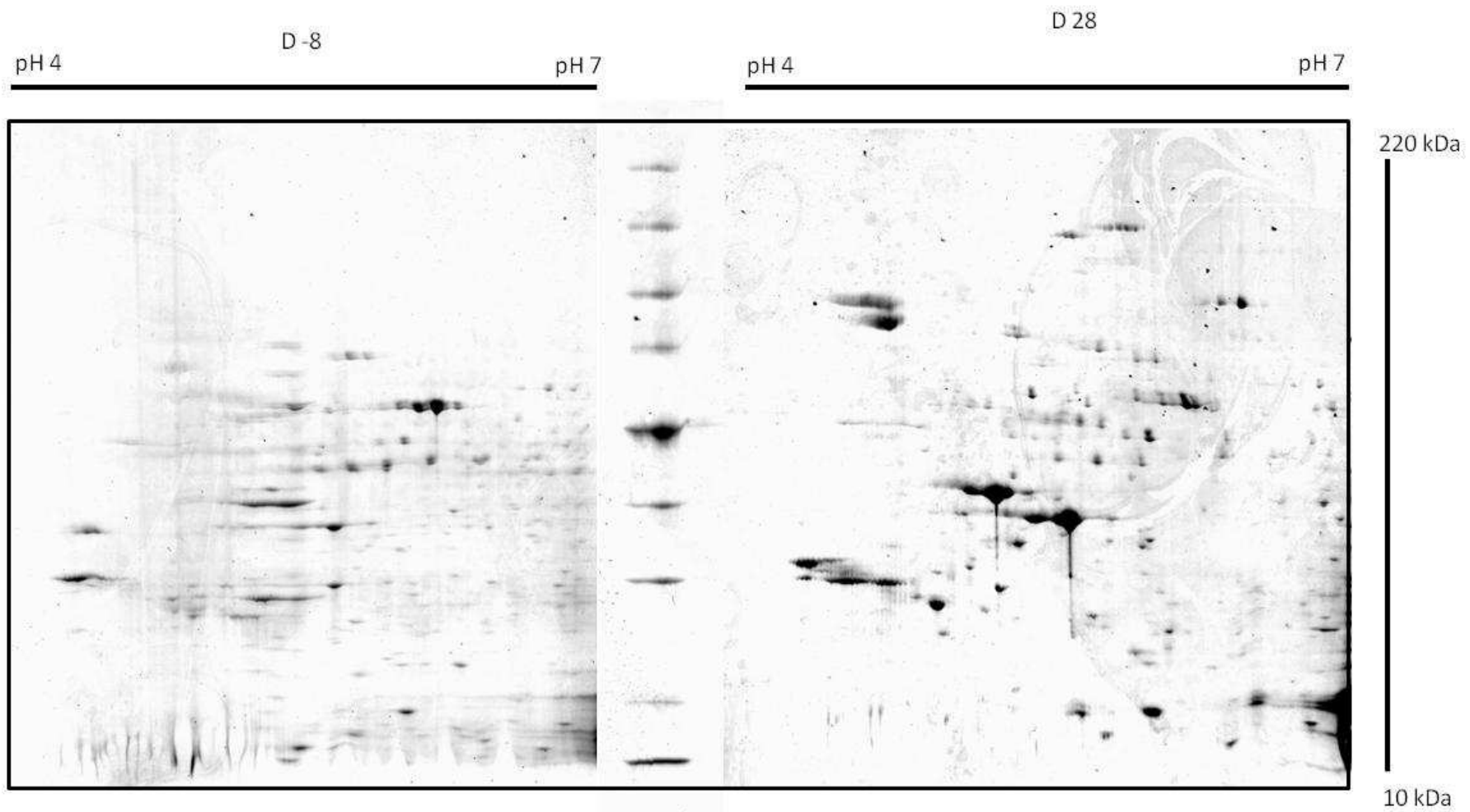
O mesmo ocorre com os géis dos pacientes 90 (figura 26) e 75 (figura 27). O paciente 90 realizou transplante para tratar um Linfoma de Hodgkin, e recebeu células-tronco de sangue periférico mobilizado, assim como o paciente 52. Porém, este paciente teve uma maior expressão de proteínas antes do transplante do que no dia do diagnóstico da doença. Mas, da mesma forma que o paciente 52, algumas proteínas mudam completamente a expressão do pré-transplante para o dia do diagnóstico da doença.

Já o paciente 75 realizou transplante para o tratamento de uma LMC em 1ª remissão completa. Ele recebeu células-tronco originadas de medula óssea. Este paciente desenvolveu DECHa no D+45, e nós obtivemos amostras deste paciente nos D+28, D+45 e D+100. Este paciente teve uma DECHa continuada, e por causa do tratamento da doença acabou recaindo da doença de base e foi a óbito no D+124. Portanto, nós temos um momento do paciente sem DECHa (D+28) e dois momentos com a doença (D+45 e D+100). Ocorre uma mudança no padrão de expressão das proteínas entre os dias 28 e 45. Com o tratamento, no D+100, o paciente volta a ter um perfil semelhante ao D+28, porém conseguimos perceber modificações sutis entre os géis do D+28 e D+100.

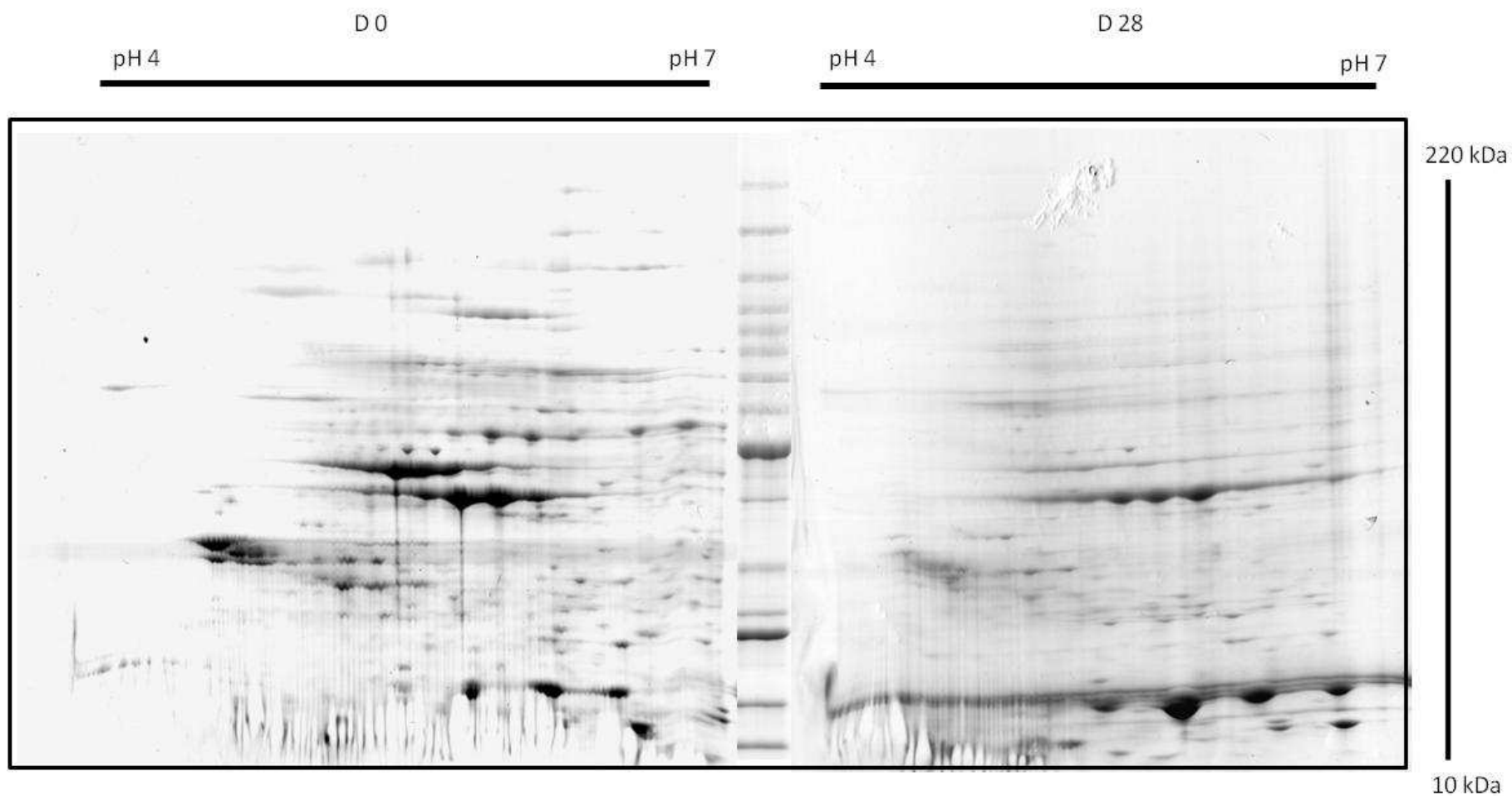
Todos os *spots* visualizados em todos os géis obtidos das amostras dos 15 pacientes no dia da DECHa foram retirados, tripsinizados e os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massas. Foi possível desta forma identificar proteínas sempre presentes em todas as amostras estudadas, que foram consideradas como proteínas constantes em células mononucleares de pacientes submetidos ao transplante que apresentaram DECHa. Algumas destas proteínas apresentaram variações

quantitativas consideráveis nas situações patológicas das diferentes amostras estudadas que serão analisadas posteriormente.

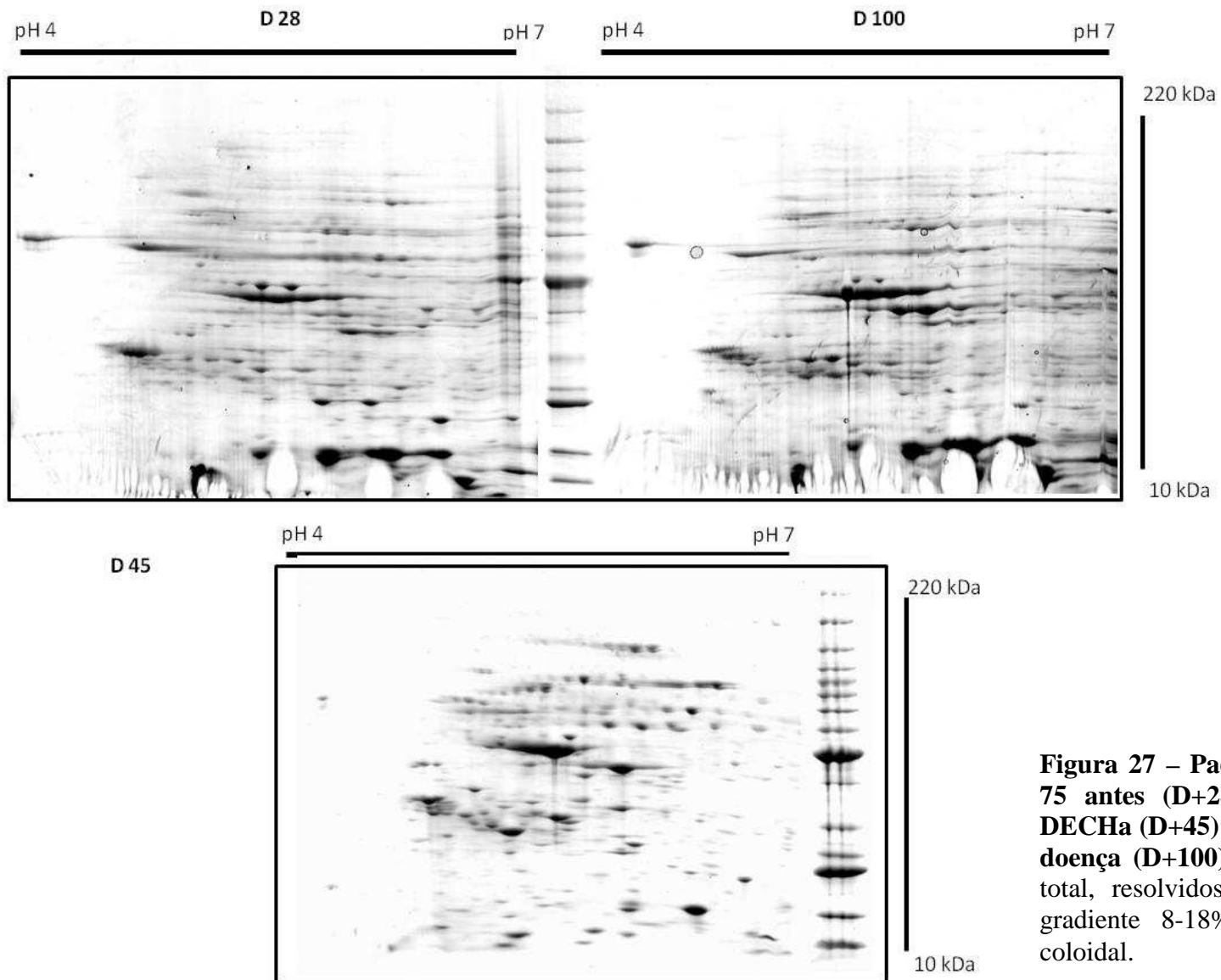
É interessante ressaltar que várias proteínas foram identificadas em vários spots do mesmo gel ou de géis distintos, mostrando diferenças de PM e PI para os equivalentes teóricos. Este fato indica que modificações pós-tradução podem contribuir para este perfil e possivelmente para a fisiologia da célula estudada. Essas proteínas estão relacionadas na tabela XVIII, que mostra o perfil proteômico descritivo destas amostras.



**Figura 25 – Padrões bidimensionais do paciente 52 antes (D-8) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+28).** Géis 2D com 300 µg de extrato total, resolvidos na janela de análise pH 4-7 e gradiente 8-18%, corados com coomassie blue coloidal.



**Figura 26 – Padrões bidimensionais do paciente 90 antes (D0) e no dia do diagnóstico da DECHA (D+28).** Géis 2D com 300 µg de extrato total, resolvidos na janela de análise pH 4-7 e gradiente 8-18%, corados com coomassie blue coloidal.



**Figura 27 – Padrões bidimensionais do paciente 75 antes (D+28) e no dia do diagnóstico da DECHa (D+45) e após o diagnóstico, ainda com a doença (D+100). Géis 2D com 300 µg de extrato total, resolvidos na janela de análise pH 4-7 e gradiente 8-18%, corados com coomassie blue coloidal.**



Tabela XVIII – Spots protéicos identificados por espectrometria de massas.

NOME	IPI	PM/PI (teórico)	PM/PI (experimental)	Cobertura	Nº de peptídeo match	Seqüência de peptídeos	Íon score	Score
ACTA2 Actin, aortic smooth muscle	IPI00008603	42381/5,29	40805/5,10	7%	2	K.SYELPDGQVITIGNER.F K.QEYDEAGPSIVHR.K	44 1	45
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	32224/4,74	20%	6	K.AGFAGDDAPR.A R.AVFPSIVGRPR.H K.IWHHTFYNELR.V R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A R.GYSFTTTAER.E	27 5 50 71 47	253
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	12202/5,56	9%	2	K.SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	55 22	55
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	25182/4,64	6%	3	R.GYSFTTTAER.E K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M Oxidação (M)	48 97 17	92
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	23554/4,80	6%	2	R.GYSFTTTAER.E K.SYELPDGQVITIGNER.F	27 82	109
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	22083/4,88	12%	3	R.GYSFTTTAER.E K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M Oxidação (M)	48 97 17	163
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	36584/4,99	18%	4	K.IWHHTFYNELR.V R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S Oxidação (M)	26 38 3 75	142
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	18742/5,18	20%	5	K.SYELPDGQVITIGNER.F K.IWHHTFYNELR.V R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A R.GYSFTTTAER.E K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M Oxidação (M)	116 51 116 50 112 44	373
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	30099/5,19	17%	4	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A R.GYSFTTTAER.E K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M Oxidação (M)	83 9 81 5	177
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	28224/5,35	18%	3	R.GYSFTTTAER.E K.LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK.S Oxidação (M) K.SYELPDGQVITIGNER.F	29 8 82	120
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	29417/5,31	10%	3	R.GYSFTTTAER.E	28	174

						K.SYELPDGQVITIGNER.F	101	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	45	
						R.GYSFTTTAER.E	32	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	31658/5,58	16%	4	K.SYELPDGQVITIGNER.F	93	206
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	4	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	76	
						R.GYSFTTTAER.E	3	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	33055/5,57	10%	3	K.SYELPDGQVITIGNER.F	78	130
						K.QEYDESGPSIVHR.K	49	
						R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	104	
						R.GYSFTTTAER.E	29	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	33328/5,41	20%	5	K.SYELPDGQVITIGNER.F	91	315
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	10	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	81	
						K.IWHHTFYNELR.V	46	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	39283/5,41	14%	4	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	63	230
						R.GYSFTTTAER.E	30	
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	91	
						R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	93	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	52462/5,31	20%	5	R.GYSFTTTAER.E	28	306
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	105	
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	20	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	60	
						R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	76	
						R.GYSFTTTAER.E	46	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	46753/6,08	20%	5	K.SYELPDGQVITIGNER.F	96	305
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	20	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	68	
						R.AVFPSIVGRPR.H	19	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	46753/6,08	20%	5	K.IWHHTFYNELR.V	61	306
						R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	102	
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	105	
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	21	
						R.AVFPSIVGRPR.H	1	
						K.IWHHTFYNELR.V	46	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	46753/6,08	20%	5	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	87	250
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	101	
						K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	15	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	46753/6,08	12%	3	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	53	161
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	87	

						K.QEYDESGPSIVHR.K	21	
ACTB Actin, cytoplasmic 1	IPI00021439	42052/5,29	38453/5,29	15%	4	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	46	131
						R.GYSFTTTAER.E	14	
						K.SYELPDGQVITIGNER.F	65	
						K.QEYDESGPSIVHR.K	6	
ACTBL2 Beta-actin-like protein 2	IPI00003269	42318/5,39	65654/5,57	9%	2	R.VAPDEHPILLTEAPLNPK.I	4	38
						R.SYELPDGQVITIGNER.F	35	
						R.AEPEDHYFLLTEPPLNTPENR.E	86	
ACTR3 Actin-related protein 3	IPI00028091	47797/5.61	51223/5,78	13%	4	R.DITYFIQQLLR.D	55	177
						R.DREVGIPPEQSLETAK.A	13	
						K.EFSIDVGYER.F	23	
						R.AEPEDHYFLLTEPPLNTPENR.E	86	
ACTR3 Actin-related protein 3	IPI00028091	47797/5.61	59003/5,79	13%	4	R.DITYFIQQLLR.D	55	177
						R.DREVGIPPEQSLETAK.A	13	
						K.EFSIDVGYER.F	23	
						R.DYPDFSPSVDAAEAIQK.A	58	
ANXA3 Annexin A3	IPI00024095	36524/5.63	34501/5,61	18%	5	K.GAGTNEDALIEILTTR.T	91	226
						K.LTFDEYR.N	31	
						R.NTPAFLAER.L	30	
						K.GIGTDEFTLNR.I	16	
ANXA3 Annexin A3	IPI00024095	36524/5,63	33792/5,57	18%	5	R.DYPDFSPSVDAAEAIQK.A	58	226
						K.GAGTNEDALIEILTTR.T	91	
						K.LTFDEYR.N	31	
						R.NTPAFLAER.L	30	
						K.GIGTDEFTLNR.I	16	
						R.DYPDFSPSVDAAEAIQK.A	74	
ANXA3 Annexin A3	IPI00024095	36524/5,63	38201/5,66	21%	6	K.GAGTNEDALIEILTTR.T	129	344
						K.LTFDEYR.N	37	
						R.NTPAFLAER.L	17	
						K.GIGTDEFTLNR.I	41	
						K.HYGYSLYSAIK.S	46	
ANXA5 Annexin A5	IPI00329801	35971/4.94	33289/4,85	16%	5	R.GTVTDFPGFDER.A	24	78
						K.GLGTDEESILLLTSR.S	28	
						R.LYDAYELK.H	3	
						K.FITIFGTR.S	7	
ANXA5 Annexin A5	IPI00329801	35971/4,94	34160/4,92	30%	7	R.SEIDLFNIR.K	15	293
						R.GTVTDFPGFDER.A	60	
						K.GLGTDEESILLLTSR.S	58	
						K.QVYEEYGSLEDDVVGDTSGYYQR.M	69	
						K.FITIFGTR.S	31	

						K.YMTISGFQIEETIDR.E Oxidação (M)	18	
						R.SEIDLFNIR.K	44	
						K.NFATSLYSMIK.G Oxidação (M)	13	
ANXA6 annexin VI isoform 2	IPI00002459	75571/5.46	36048/6,49	8%	4	K.GLGTDEDTIIDIITHR.S	51	99
						K.SLEDALSSDTSGHFR.R	3	
						R.DAFVAIVQSVK.N	15	
						K.SLHQAIEGDTSGDFLK.A	30	
						K.GLGTDEDTIIDIITHR.S	51	
ANXA6 annexin VI isoform 2	IPI00002459	75571/5,46	38571/6,40	8%	4	K.SLEDALSSDTSGHFR.R	3	99
						R.DAFVAIVQSVK.N	15	
						K.SLHQAIEGDTSGDFLK.A	30	
						K.GLGTDEDTIIDIITHR.S	39	
						K.SLEDALSSDTSGHFR.R	29	
ANXA6 annexin VI isoform 2	IPI00002459	75571/5,46	38571/6,40	4%	2	R.DYVVSQFEGSALGK.Q	43	68
						K.VQPYLDDFQK.K	29	
						R.THLAPYSDEL.R.Q	28	
						K.VSFLSALEEYTK.K	38	
						K.SIQEIQELDKDDESLR.K	26	
ARHGDIA Rho GDP-dissociation inhibitor 1	IPI00003815	23250/5.02	27936/4,90	31%	4	K.IDKTDYMGVSYGPR.A	5	82
						R.AEEYEFLTPVEEAPK.G	49	
						R.FTDDDKTDHLSWEWNLSIK.K	2	
						K.SIQEIQELDKDDESLR.K	70	
						K.TDYMVGSYGPR.A Oxidação (M)	12	
ARHGDIA Rho GDP-dissociation inhibitor 1	IPI00003815	23250/5,02	29098/4,93	20%	3	R.AEEYEFLTPVEEAPK.G	45	127
						K.APEPHVEEDDDDELDSK.L	78	
						K.LNYKPPPQK.S	31	
						K.TLLGDGPVVTDPK.A	19	
						K.YVQHTYR.T	39	
ARHGDIB Rho GDP-dissociation inhibitor 2	IPI00003817	23031/5.10	27688/5,06	22%	4	K.YVQHTYR.T	38	80
						K.SFFTDDDKQDHLSWEWNLSIK.K	42	
						R.LTLVCESAPGPITMDLTGDLEALKK.E Oxidação (M)	23	
						K.YVQHTYR.T	23	
						K.ATFMVGSYGPRPEEYEFLLTPVEEAPK.G Oxidação (M)	9	
ARHGDIB Rho GDP-dissociation inhibitor 2	IPI00003817	23031/5,10	19511/6,17	39%	4	K.SFFTDDDKQDHLSWEWNLSIK.K	39	94
						K.APEPHVEEDDDDELDSK.L	22	
						K.YVQHTYR.T	53	
						K.SFFTDDDKQDHLSWEWNLSIK.K	35	
						R.LVLEVAQHLGESTVR.T	26	
ARHGDIB Rho GDP-dissociation inhibitor 2	IPI00003817	23031/5,10	29675/5,07	22%	3	K.AHGGYSVFAGVGER.T	41	110
						K.SFFTDDDKQDHLSWEWNLSIK.K	35	
						R.LVLEVAQHLGESTVR.T	26	
						K.AHGGYSVFAGVGER.T	41	
						K.VALVYQGMNEPPGAR.A Oxidação (M)	22	
ATP5B ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	IPI00303476	56525/5.26	55075/4,98	17%	6			299

						R.VALTGLTVAEYFR.D	64	
						R.DQEGQDVLLFIDNIFR.F	65	
						R.AIAELGIYPAVDPLDSTSR.I	81	
						R.LVLEVAQHLGESTVR.T	26	
						K.AHGGYSVFAGVGER.T	41	
ATP5B ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	IPI00303476	56525/5,26	58376/5,00	17%	6	K.VALVYQGMNEPPGAR.A Oxidação (M)	22	299
						R.VALTGLTVAEYFR.D	64	
						R.DQEGQDVLLFIDNIFR.F	65	
						R.AIAELGIYPAVDPLDSTSR.I	81	
						K.EQFLDGDGWTSR.W	94	
CALR Calreticulin precursor	IPI00020599	48283/4,29	67070/4,19	17%	6	R.FYALSASFEPFSNK.G	92	327
						K.HEQNIDCGGGYVK.L	40	
						K.KVHVIFNYK.G	48	
						K.VHVIFNYK.G	39	
						R.CKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK.I	15	
CALR Calreticulin precursor	IPI00020599	48283/4,29	61760/4,08	6%	2	K.EQFLDGDGWTSR.W	46	105
						R.FYALSASFEPFSNK.G	60	
						K.EQFLDGDGWTSR.W	94	
CALR Calreticulin precursor	IPI00020599	48283/4,29	59213/4,20	17%	6	R.FYALSASFEPFSNK.G	92	327
						K.HEQNIDCGGGYVK.L	40	
						K.KVHVIFNYK.G	48	
						K.VHVIFNYK.G	39	
						R.CKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVK.I	15	
CALR Calreticulin precursor	IPI00020599	48283/4,29	56234/4,20	13%	3	K.EQFLDGDGWTSR.W	23	153
						R.FYALSASFEPFSNK.G	94	
						K.KVHVIFNYK.G	35	
CANX Calnexin precursor	IPI00020984	67982/4,47	69133/4,43	7%	4	K.APVPTGEVYFADSFDR.G	56	158
						K.TPELNLDQFHDK.T	45	
						R.KIPNPDFFEDLEPFR.M	49	
						K.IPNPDFFEDLEPFR.M	8	
CAP1 Adenylyl cyclase-associated protein 1	IPI00008274	52222/8,27	18049/5,30	9%	2	R.VENQENVSNLVIETELK.Q	20	40
						K.SSEMNVLIPTEGGDFNEFPVPEQFK.T Oxidação (M)	20	
CAPNS1 Calpain small subunit 1	IPI00025084	28469/5,05	26957/4,78	18%	3	R.ILGGVISAISEAAAQYNPEPPPR.T	19	76
						R.THYSNIEANESEEV.R.Q	44	
						K.TDGFGIDTCR.S	13	
CAPZA1 F-actin-capping protein subunit alpha-1	IPI00005969	33073/5,45	36283/5,5	22%	4	K.FITHAPPGEFNEVFNDVR.L	63	141
						R.LLLNNDNLLR.E	29	
						K.IEGYEDQVLITEHGDGNSR.F	22	
						K.IQVHYEDGNVQLVSHK.D	28	
CAPZB Isoform 1 of F-actin-	IPI00026185	31616/5,36	22597/5,54	18%	5	K.DYLLCDYNR.D	12	97

<b>capping protein subunit beta</b>						K.YDPPLEDGAMPSAR.L Oxidação (M)	7	
						R.KLEVEANNAFDQYR.D	42	
						K.LEVEANNAFDQYR.D	9	
						K.GCWDSIHVVEVQEK.S	29	
						K.AVLFLCSEDKK.N	13	
<b>CFL1 Cofilin-1</b>	IPI00012011	18719/8.22	18893/6,51	43%	5	K.EILVGDVGGQTVDDPYATFVK.M	36	141
						R.YALYDATYETK.E	37	
						K.KEDLVFIFWAPESAPLK.S	34	
						K.HELQANCYEEVKDR.C	22	
						K.IGNCPFSQR.L	24	
						K.IEEFLEAVLCPPR.Y	56	
<b>CLIC1 Chloride intracellular channel protein 1</b>	IPI00010896	27248/5,09	32039/5,19	34%	6	K.LAALNPESNTAGLDIFAK.F	123	466
						K.VLDNYLTSPLPEEVDETSAEDEGVSR.K	171	
						R.GFTIPEAFR.G	45	
						R.YLSNAYAR.E	47	
<b>COTL1 Coactosin-like protein</b>	IPI00017704	16049/5,54	16741/5,33	30%	2	K.YDGSTIVPGEQGAEYQHFIQQCTDDVR.L	17	54
						K.FALITWIGENVSGLQR.A	38	
						K.FDGILGMAYPR.I Oxidação (M)	34	
<b>CTSD Cathepsin D precursor</b>	IPI00011229	45037/6,10	30349/5,71	11%	3	K.LVDQNIFSFYLSR.D	51	89
						K.EGCEAIVDTGTSLMVGPDVEVR.E Oxidação (M)	4	
<b>DEFA1;LOC728358 Neutrophil defensin 1 precursor</b>	IPI00005721	10536/6,54	9724/6,47	19%	2	R.IPACIAGER.R	51	98
						R.YGTCIYQGR.L	47	
						R.AAVPSGASTGIYEALELR.D	26	
<b>ENO1 Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase</b>	IPI00465248	47481/5.29	51318/6,46	14%	5	K.VVIGMDVAASEFFR.S	8	89
						K.VVIGMDVAASEFFR.S Oxidação (M)	18	
						R.YISPDQLADLYK.S	21	
						K.FTASAGIQVVGDDLTVTNP.K.R	24	
						K.GALPLDVTTFYK.V	20	
						K.FDTQYPYGEK.Q	41	
<b>ERP29 Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor</b>	IPI00024911	29032/6.77	26188/5,87	27%	7	K.LDKESYPVFYLF.R.D	24	254
						R.DGDFENPVPTGAVK.V	64	
						K.WAEQYLK.I	40	
						K.ILDQGEDFPASEMTR.I	65	
						K.ILDQGEDFPASEMTR.I Oxidação (M)	53	
						K.GALPLDVTTFYK.V	14	
<b>ERP29 Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor</b>	IPI00024911	29032/6,77	30347/5,90	18%	4	K.FDTQYPYGEK.Q	13	62
						R.DGDFENPVPTGAVK.V	24	
						K.SLNILTAFAQ.K	11	
<b>FGB Fibrinogen beta chain precursor</b>	IPI00298497	56577/8,54	54185/5,94	5%		K.HQLYIDETVNSNIPTNLR.V	55	72
						K.IRPFPPQQ.-	17	

<b>FGB Fibrinogen beta chain precursor</b>	IPI00298497	56577/8,54	56174/6,16	7%	3	K.HQLYIDETVNSNIPTNLR.V	34	64
						K.EDGGGWYNR.C	5	
						K.IRPFPPQQ.-	24	
<b>FGG Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain precursor</b>	IPI00219713	50092/5.70	51510/5,62	25%	3	K.YEASILTHDSSIR.Y	3	82
						K.IHLISTQSAIPYALR.V	5	
						R.LTIGEGQQHHLGGAK.Q	25	
<b>FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain precursor</b>	IPI00021891	52106/5,37	59003/5,63	14%	4	K.AIQLTYNPDESSKPNMIDAATLK.S	6	67
						K.YEASILTHDSSIR.Y	32	
						K.IHLISTQSAIPYALR.V	13	
<b>FGG Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain precursor</b>	IPI00021891	52106/5,37	58689/5,52	11%	4	R.LTIGEGQQHHLGGAK.Q	17	113
						K.YEASILTHDSSIR.Y	51	
						K.QSGLYFIKPLK.A	10	
<b>FLNA filamin A, alpha isoform 1</b>	IPI00302592	282581/5.69	90890/5,71	2%	4	K.IHLISTQSAIPYALR.V	25	78
						R.LTIGEGQQHHLGGAK.Q	27	
						K.YNEQHVPGPSPTAR.V	9	
<b>FLNA filamin A, alpha isoform 1</b>	IPI00302592	282581/5,69	127045/6,11	3%	6	K.VGSAADIPINISSETDLSLLTATVVPSPGR.E	14	165
						K.FNEEHIPDSPFVVPVSPSGDAR.R	28	
						K.YGGPYHIGGSPFK.A	28	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5.51	22507/5,38	36%	5	K.YNEQHVPGPSPTAR.V	39	404
						R.VSQQLHEGHTFEPAEFIIDTR.D	5	
						R.AEAGVPAEFSIWTR.E	9	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	K.FNEEHIPDSPFVVPVSPSGDAR.R	46	404
						K.YGGPYHIGGSPFK.A	53	
						K.WGDEHIPGSPYR.V	13	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	R.DDVALEGVSHFFR.E,	117	347
						K.KLNQALLDLHALGSAR.T	77	
						K.LNQALLDLHALGSAR.T	63	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	29	347
						R.LGGPEAGLGEYLFER.L	122	
						R.DDVALEGVSHFFR.E,	117	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	K.KLNQALLDLHALGSAR.T	77	347
						K.LNQALLDLHALGSAR.T	63	
						R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	29	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	R.LGGPEAGLGEYLFER.L	122	279
						R.DDVALEGVSHFFR.E	64	
						K.KLNQALLDLHALGSAR.T	83	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	K.LNQALLDLHALGSAR.T	52	279
						R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	44	
						R.LGGPEAGLGEYLFER.L	104	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	19691/5,44	36%	5	R.DDVALEGVSHFFR.E	89	279

						K.KLNQALLDLHALGSAR.T	16	
						K.LNQALLDLHALGSAR.T	24	
						R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	33	
						R.LGGPEAGLGEYLFER.L	118	
						R.DDVALEGVSHFFR.E	27	
<b>FTL Ferritin light chain</b>	IPI00738499	20064/5,51	21633/5,58	36%	5	K.KLNQALLDLHALGSAR.T	67	261
						K.LNQALLDLHALGSAR.T	35	
						R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	8	
						R.LGGPEAGLGEYLFER.L	124	
<b>FTL Ferritin light polypeptide variant</b>	IPI00375676	21340/5,70	19691/5,44	8%	2	K.KLNQALLDLHALGSAR.T	51	68
						K.LNQALLDLHALGSAR.T	17	
<b>GRB2 Isoform 1 of Growth factor receptor-bound protein 2</b>	IPI00021327	25304/5,89	25554/6,09	8%	2	K.FNSLNELVDYHR.S	42	62
						R.NQQIFLR.D	20	
<b>GRB2 Isoform 1 of Growth factor receptor-bound protein 2</b>	IPI00021327	25304/5,89	28595/6,07	8%	2	K.FNSLNELVDYHR.S	42	62
						R.NQQIFLR.D	20	
<b>GSN Isoform 1 of Gelsolin precursor</b>	IPI00026314	86043/5,90	16263/6,03	6%	3	K.EPGLQIWR.V	31	136
						K.FDLVPVPTNLYGDFFTGDAYVILK.T	19	
						R.EVQGFESATFLGYFK.S	86	
<b>GSN Isoform 1 of Gelsolin precursor</b>	IPI00026314	86043/5,90	109027/5,88	4%	3	K.EPGLQIWR.V	7	61
						R.EVQGFESATFLGYFK.S	34	
						K.HVVPNEVVVQR.L	20	
						M.PPYTVVYFPVR.G	66	
<b>GSTP1 Glutathione S-transferase P</b>	IPI00219757	23569/5,43	23271/5,51	42%	6	R.MLLADQGQSWK.E Oxidação (M)	2	196
						K.EEVTVETWQEGSLK.A	28	
						K.FQDGLTLYQSNTILR.H	49	
						K.DQQAALVDMVNDGVEDLR.C Oxidação (M)	30	
						K.YISLIYTNYEAGKDDYVK.A	21	
<b>GSTP1 Glutathione S-transferase P</b>	IPI00219757	23569/5,43	13212/4,44	21%	2	M.PPYTVVYFPVR.G	46	82
						K.FQDGLTLYQSNTILR.H	36	
						M.PPYTVVYFPVR.G	66	
<b>GSTP1 Glutathione S-transferase P</b>	IPI00219757	23569/5,43	23231/5,41	42%	6	R.MLLADQGQSWK.E Oxidação (M)	2	196
						K.EEVTVETWQEGSLK.A	28	
						K.FQDGLTLYQSNTILR.H	49	
						K.DQQAALVDMVNDGVEDLR.C Oxidação (M)	30	
						K.YISLIYTNYEAGKDDYVK.A	21	
<b>GSTP1 Glutathione S-transferase P</b>	IPI00219757	23569/5,43	24656/5,50	43%	6	M.PPYTVVYFPVR.G	77	304
						R.MLLADQGQSWK.E Oxidação (M)	16	
						K.EEVTVETWQEGSLK.A	59	
						K.FQDGLTLYQSNTILR.H	86	
						K.YISLIYTNYEAGKDDYVK.A	37	



						K.ALPGQLKPFETLLSQNQGK.T	30	
H2AFY H2A histone family, member Y isoform 2	IPI00059366	39635/9,78	22208/5,62	11%	3	K.EFVEAVLELR.K	51	
						K.NGPLEVAGAAVSAGHGLPAK.F	19	76
						K.SIAFPSIGSGR.N	6	
						K.EFVEAVLELR.K	51	
H2AFY H2A histone family, member Y isoform 2	IPI00059366	39635/9,78	25309/5,65	11%	3	K.NGPLEVAGAAVSAGHGLPAK.F	19	76
						K.SIAFPSIGSGR.N	6	
HNRNPA2B1 HNRPA2B1 protein	IPI00386854	28451/4,79	12981/6,19	10%	3	R.KLFIGGLSFETTEESLR.N	21	
						K.LFIGGLSFETTEESLR.N	111	152
						R.NYYEQWGK.L	20	
						R.GLPWSCSADEVQR.F	19	
HNRNPH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	IPI00013881	49484/5,89	23796/6,67	14%	4	R.EGRPSGEAFVELESEDEVK.L	33	147
						K.HTGPNPDTANDGFVR.L	56	
						R.STGEAFVQFASQEIAEK.A	40	
HPCAL1 Hippocalcin-like protein 1	IPI00219344	22413/5,21	20269/4,91	24%	2	R.PEVLQD.L	12	36
						K.MPEDESTPE.K	24	
HSPA1B;HSPA1A Heat shock 70 kDa protein 1	IPI00304925	70294/5,48	81081/5,53	6%	3	R.TTPSYVAFTDTER.L	12	
						R.IINEPTAAAIAAYGLDR.T	48	99
						R.LVNHFVEEFKR.K	40	
						R.ITPSYVAFTPEGER.L	32	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	81695/4,90	9%	4	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR.Q	31	144
						K.KSDIDEIVLVGGSTR.I	32	
						K.DNHLLGTFDLTGIPPAPR.G	49	
						R.ITPSYVAFTPEGER.L	28	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	44455/5,20	4%	2	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR.Q	58	86
						R.ITPSYVAFTPEGER.L	16	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	44190/5,09	8%	4	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR.Q	22	68
						R.AKFEELNMDLFR.S Oxidação (M)	13	
						K.KSDIDEIVLVGGSTR.I	16	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	27435/4,71	5%	2	K.DNHLLGTFDLTGIPPAPR.G	69	69
						R.GVPQIEVTFEIDVNGILR.V	0	
						R.ITPSYVAFTPEGER.L	66	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	52462/5,31	7%	4	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR.Q	55	239
						K.KSDIDEIVLVGGSTR.I	73	
						K.SDIDEIVLVGGSTR.I	46	
						R.ITPSYVAFTPEGER.L	32	
HSPA5 HSPA5 protein	IPI00003362	72492/5,07	85515/4,91	9%	4	K.VTHAVVTVPAYFNDAQR.Q	31	144
						K.KSDIDEIVLVGGSTR.I	32	
						K.DNHLLGTFDLTGIPPAPR.G	49	
HSPA8 Isoform 1 of Heat shock	IPI00003865	71082/5,37	67792/5,85	12%	5	R.TTPSYVAFTDTER.L	8	167

<b>cognate 71 kDa protein</b>						K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	61	
						K.STAGDTHLGGEDFDNR.M	41	
						R.FEELNADLFR.G	49	
						K.QTQFTTYSNQPGLVLIQVYEGER.A	8	
						R.TTPSYVAFTDTER.L	7	
<b>HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein</b>	IPI00003865	71082/5,37	83180/5,38	14%	5	K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	47	
						R.TLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR.A	57	189
						R.FEELNADLFR.G	40	
						K.QTQFTTYSNQPGLVLIQVYEGER.A	37	
						R.LFDQAFGLPR.L	42	
<b>HSPB1 Heat shock protein beta-1</b>	IPI00025512	22826/5.98	22507/5,38	20%	3	R.VSLDVNHFAPDELTVK.T	37	108
						K.LATQSNEITIPVTFESR.A	29	
						K.LDDGHLNNSLSSPVQADVYFPR.L	70	
<b>HSPC159 Galectin-related protein</b>	IPI00023549	19202/5.12	20045/4,86	31%	3	R.GEEQSAIPYFPFIPDQFPR.V	52	176
						R.VFVDGHQLDFYHR.I	55	
<b>HSPD1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor</b>	IPI00784154	61187/5.70	62845/5,28	11%	3	K.LVQDVANNTNEAGDGTATVLR.S	13	
						K.ISSIQIVPALEIANHR.K	9	51
						R.KPLVIIAEDVDGEALSTLVLR.L	28	
<b>ITGA2B integrin alpha 2b preproprotein</b>	IPI00218629	114446/5.21	21767/4,31	2%	2	R.GEAQVWTQLLR.A	82	114
						R.NRPLEEDDEEGE.-	32	
<b>KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10</b>	IPI00009865	59703/5,13	37813/6,40	5%	2	K.NQILNLTTDNANILLQIDNAR.L	36	52
						R.LENEIQTYR.S	16	
<b>KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10</b>	IPI00009865	59703/5,13	11348/5,93	10%	3	K.NQILNLTTDNANILLQIDNAR.L	37	
						R.NVSTGDVNVEMNAAPGVDLTQLNNMR.S	52	152
						R.NVQALEIELQSQLALK.Q	63	
<b>KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9</b>	IPI00019359	62320/5,19	76713/5,17	6%	2	R.HGVQELEIELQSQLSK.K	21	34
						K.EIETYHNLLEGGQEDFESSGAGK.I	13	
						K.IGLFADIELSR.N	48	
						R.NEALIALLR.E	13	
<b>LCP1 Plastin-2</b>	IPI00010471	70815/5.20	71604/5,19	14%	7	K.GDEEGVPAVVIDMGLR.E Oxidação (M)	23	
						K.LNLAFIANLFNR.Y	24	294
						K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T	63	
						R.YTLNILEEIGGGK.V	64	
						K.VNDDIIVNWVNETLR.E	60	
<b>LCP1 Plastin-2</b>	IPI00010471	70815/5,20	52785/5,32	4%	2	K.LNLAFIANLFNR.Y	30	56
						K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T	26	
						K.IGLFADIELSR.N	66	
<b>LCP1 Plastin-2</b>	IPI00010471	70815/5,20	52785/5,32	8%	4	K.LNLAFIANLFNR.Y	79	291
						K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T	63	
						K.VNDDIIVNWVNETLR.E	53	

LCP1 Plastin-2	IPI00010471	70815/5,20	52758/5,32	7%	4	K.IGLFADIELSR.N K.LSPEELLR.W K.AYYHLLQVAPK.G K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T K.AYYHLLQVAPK.G	7 22 46 28 23	104
LCP1 Plastin-2	IPI00010471	70815/5,20	66478/5,50	7%	3	K.GDEEGVPAVVIDMSGLR.E Oxidação (M) K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T	6 38	67
LCP1 Plastin-2	IPI00010471	70815/5,20	65073/5,39	12%	6	K.IGLFADIELSR.N K.LSPEELLR.W K.GDEEGVPAVVIDMSGLR.E Oxidação (M) K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T R.YTLNILEEIGGGQK.V R.VYALPEDLVEVNP K.M	60 10 20 86 19 27	223
LCP1 Plastin-2	IPI00010471	70815/5,20	78032/5,35	14%	7	K.IGLFADIELSR.N R.NEALIALLR.E K.GDEEGVPAVVIDMSGLR.E Oxidação (M) K.LNLAFIANLFNR.Y K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T R.YTLNILEEIGGGQK.V K.VNDDIIVNWVNETLR.E	48 13 23 24 63 64 60	294
LCP1 Plastin-2	IPI00010471	70815/5,20	77370/5,23	11%	6	K.IGLFADIELSR.N R.NEALIALLR.E K.LSPEELLR.W K.LNLAFIANLFNR.Y K.FSLVGIGGQDLNEG NR.T K.VNDDIIVNWVNETLR.E	27 24 9 9 44 9	123
LGALS1 Galectin-1	IPI00219219	15048/5.34	14179/4,99	45%	5	K.DSNNLCLHFNR.F R.FNAHGDANTIVCNSK.D K.DGGAWGTEQR.E K.LPDGYEFK.F R.LNLEAINYMAADGDFK.I Oxidação (M)	58 73 62 46 98	364
LGALS1 Galectin-1	IPI00219219	15048/5,34	15496/5,02	20%	2	K.DSNNLCLHFNR.F R.LNLEAINYMAADGDFK.I Oxidação (M) R.ATSNV FAMDQSQIQEFK.E Oxidação (M) R.DGFIDKEDLHDMLASLGK.N Oxidação (M)	31 22 32 27	53
MRLC2 Myosin regulatory light chain	IPI00033494	19824/4.71	19186/4,71	44%	5	R.NAFACFDEEATGTIQEDYLR.E R.FTDEEVDELYR.E K.GNFNYIEFTR.I	44 58 26	187
MTPN Myotrophin	IPI00179589	14508/5.92	11362/5.02	50%	3	R.QGILHLK K.IMFLGEDVNR TLEGG.R	24 45	152

						K.PLHYAADCGQLEILEFLLL.K	81	
						K.EAFQLFDR.T	41	
<b>MYL6;MYL6B Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6</b>	IPI00335168	17090/4.56	16977/4,18	33%	5	K.ILYSQCGDVMR.A Oxidação (M)	3	
						K.VLDFEHFLPMLQTVAK.N Oxidação (M)	47	244
						K.NKDQGTIEDYVEGLR.V	86	
						K.DQGTIEDYVEGLR.V	66	
						K.EAFQLFDR.T	46	
<b>MYL6;MYL6B Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6</b>	IPI00335168	17090/4,56	16037/4,08	25%	4	K.VLDFEHFLPMLQTVAK.N Oxidação (M)	55	
						K.NKDQGTIEDYVEGLR.V	81	253
						K.DQGTIEDYVEGLR.V	70	
						R.ATSNVFMFDQSQIQEFK.E Oxidação (M)	46	
						K.EAFNMIDQNR.D Oxidação (M)	3	
<b>MYL9 Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform</b>	IPI00220278	19871/4.80	20000/4,74	50%	6	R.DGFIDKEDLHDMLASLGK.N Oxidação (M)	19	
						R.NAFACFDEEASGFIHEDHLR.E	32	189
						R.FTDEEVDEMYR.E Oxidação (M)	18	
						K.GNFNYVEFTR.I	71	
						R.TFIAIKPDGVQR.G	24	
<b>NME1;NME2 Nucleoside diphosphate kinase A</b>	IPI00012048	17309/5.83	17576/5,91	31%	4	K.DRPFFAGLVK.Y	24	
						R.VMLGETNPADSKPGTIR.G Oxidação (M)	12	82
						R.GDFCIQVGR.N	22	
						K.VDNDENEHQSLR.T	70	
<b>NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin</b>	IPI00220740	29617/4.47	17227/4,27	20%	3	K.DELHIVEAEAMNYEGSPIK.V Oxidação (M)	8	
						K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL.L Oxidação (M)	3	81
						K.VDATEESDLAQQYGVR.G	127	
<b>P4HB Protein disulfide-isomerase precursor</b>	IPI00010796	57480/4.76	67445/4,72	14%	6	K.HNQLPLVIEFTEQTAPK.I	98	
						K.ILFIFIDSDHTDNQR.I	77	428
						R.ILEFFGLK.K	46	
						K.YKPESEELTAER.I	63	
						K.FFPASADR.T	17	
						K.VDATEESDLAQQYGVR.G	127	
<b>P4HB Protein disulfide-isomerase precursor</b>	IPI00010796	57480/4,76	60924/4,71	14%	6	K.HNQLPLVIEFTEQTAPK.I	98	
						K.ILFIFIDSDHTDNQR.I	77	428
						R.ILEFFGLK.K	46	
						K.YKPESEELTAER.I	63	
						K.FFPASADR.T	17	
<b>P4HB Protein disulfide-isomerase precursor</b>	IPI00010796	57480/4,76	64267/4,88	15%	6	K.VDATEESDLAQQYGVR.G	75	
						K.YQLDKDGVVLFK.K	19	
						K.HNQLPLVIEFTEQTAPK.I	42	265
						K.ILFIFIDSDHTDNQR.I	51	
						R.ILEFFGLK.K	38	

						K. YKPESEELTAER.I	40	
<b>PARK7 Protein DJ-1</b>	IPI00298547	20050/6.33	22657/6,35	41%	4	K.GAEEMETVIPVDVMR.R	2	160
						R.DVVICPDASLEDAKK.E	72	
						K.EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVK.E	84	
						K.GLIAAICAGPTALLAHEIGFGSK.V	1	
<b>PDCD6 Programmed cell death protein 6</b>	IPI00025277	21912/5.16	20045/4,86	19%	3	K.YITDWQNVFR.T	22	82
						R.LSDQFHDILIR.K	27	
						R.GQIAFDDFIQGCIVLQR.L	33	
						K.DASIVGFFDDSFSEAHSEFLK.A	41	
<b>PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor</b>	IPI00025252	57146/5.98	58668/5,84	13%	4	K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T	27	143
						R.FLQDYFDGNLK.R	28	
						R.ELSDFISYLQR.E	47	
						K.DLLIAYYDVVYK.N	34	
<b>PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor</b>	IPI00025252	57146/5,98	55234/5,61	13%	5	K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T	1	98
						K.FVMQEEFSR.D	7	
						R.FLQDYFDGNLK.R	29	
						R.ELSDFISYLQR.E	26	
<b>PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor</b>	IPI00025252	57146/5,98	67792/5,85	16%	7	K.DLLIAYYDVVYK.N	40	322
						K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T	84	
						K.FVMQEEFSR.D Oxidação (M)	16	
						R.FLQDYFDGNLK.R	42	
<b>PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor</b>	IPI00025252	57146/5,98	68155/5,74	17%	6	R.FLQDYFDGNLKR.Y	44	81
						R.GFPTIYFSPANK.K	37	
						R.ELSDFISYLQR.E	58	
						K.DASIVGFFDDSFSEAHSEFLK.A	8	
<b>PDIA6 Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6 precursor</b>	IPI00299571	54380/5,17	52462/5,31	6%	2	K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T	9	45
						K.FVMQEEFSR.D Oxidação (M)	13	
						R.FLQDYFDGNLK.R	13	
						R.ELSDFISYLQR.E	12	
<b>PGLS 6-phosphogluconolactonase</b>	IPI00029997	27815/5.70	31042/5,99	22%	4	K.GSFSEQGINEFLR.E	32	36
						R.GSTAPVGGGAFPTIVER.E	13	
						R.ELPAAVAPAGPASLAR.W	9	
						R.LVPFDHAESTYGLYR.T	5	
<b>PGLS 6-phosphogluconolactonase</b>	IPI00029997	27815/5,70	30050/5,88	16%	3	K.IVAPISDSPKPPQR.V	18	39
						R.VTLTLPVLNAAR.T	5	
						R.ELPAAVAPAGPASLAR.W	34	
						R.LVPFDHAESTYGLYR.T	2	
<b>PGLS 6-phosphogluconolactonase</b>	IPI00029997	27815/5,70	31777/5,91	22%	4	R.VTLTLPVLNAAR.T	3	36
						R.ELPAAVAPAGPASLAR.W	9	

						R.LVFPDHAESTYGLYR.T	5	
						K.IVAPISDSPKPPQR.V	18	
						R.VTLTLPVLNAAR.T	5	
<b>PHB Prohibitin</b>	IPI00017334	29843/5,57	33055/5,57	8%	2	R.IILFRPVASQLPR.I	2	33
						R.IFTSIGEDYDER.V	31	
						K.GKEESLSDSLYAELR.C	58	
<b>PPBP Platelet basic protein precursor</b>	IPI00022445	14171/9.04	18893/6,51	29%	4	K.EESLSDSLYAELR.C	38	165
						K.GTHCNQVEVIATLK.D	65	
						K.ICLDPDAPR.I	9	
						R.KEGGLGPLNIPLADVTR.R	39	90
<b>PRDX2 Peroxiredoxin-2</b>	IPI00027350	22049/5.66	21052/5,56	9%	2	K.EGGLGPLNIPLADVTR.R	51	
						R.VQPEAQA.K	50	
<b>PSME1 Proteasome activator complex subunit 1</b>	IPI00479722	28876/5.78	29274/5,57	22%	2	K.PEIKDVIEQLNLVTTWLQLQIP.R	92	158
<b>PSME2 Proteasome activator complex subunit 2</b>	IPI00384051	28755/6.05	29800/5,41	20%	1	K.QVEVFRQNLFQEAEEFLY.R	50	106
						K.ETHVMDY.R	40	
						K.SALTVQFVQGIFVEK.Y	69	
<b>RAP1B Ras-related protein Rap-1b precursor</b>	IPI00015148	21040/5.65	19786/5,03	24%	4	K.YDPTIEDSYR.K	27	202
						K.EQGQNLAR.Q	8	
						K.INVNEIFYDLVR.Q	97	
<b>S100A12 Protein S100-A12</b>	IPI00218131	10569/5.83	9651/6,25	21%	2	M.TKLEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	39	69
						K.LEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	30	
<b>S100A12 Protein S100-A12</b>	IPI00218131	10569/5,83	12140/6,35	21%	2	M.TKLEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	49	57
						K.LEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	8	
<b>S100A12 Protein S100-A12</b>	IPI00218131	10569/5,83	11691/6,30	21%	2	M.TKLEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	57	95
						K.LEEHLEGIVNIFHQYSVR.K	38	
<b>S100A8 Protein S100-A8</b>	IPI00007047	10885/6.51	10500/6,19	20%	2	K.GNFHAVYR.D	28	78
						K.LLETECPQYIR.K	50	
						K.ALNSIIDVYHK.Y	38	
<b>S100A8 Protein S100-A8</b>	IPI00007047	10885/6,51	10693/6,05	32%	3	K.GNFHAVYR.D	36	104
						K.LLETECPQYIR.K	29	
						R.NIETIINTFHQYSVK.L	71	
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5.71	12156/5,52	56%	4	K.LGHPDTLNQGEFK.E	76	229
						K.VIEHIMEDLDTNADK.Q Oxidação (M)	49	
						K.MHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP.- Oxidação (M)	23	
						K.LGHPDTLNQGEFK.E	48	
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	21780/4,60	24%	2	K.VIEHIMEDLDTNADK.Q Oxidação (M)	16	64
						R.NIETIINTFHQYSVK.L	19	
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	22287/4,92	24%	2	K.LGHPDTLNQGEFK.E	14	33
						R.NIETIINTFHQYSVK.L	13	39
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	9099/4,89	24%	2	K.LGHPDTLNQGEFK.E	26	

<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	9556/4,94	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	19 14	33
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	14842/5,50	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	13 26	112
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	14842/5,50	54%	4	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M) K.MHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP.- Oxidação (M)	77 80 5 20	181
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	15000/5,86	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	70 84	154
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	12140/5,90	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	30 63	93
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	10302/5,06	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	24 36	60
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	10975/5,43	49%	4	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.VIEHIMEDLDTNADK.Q Oxidação (M) K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M)	70 52 17 15	154
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	15140/5,30	35%	3	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M)	57 83 3	143
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	14724/5,57	54%	4	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M) K.MHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP.- Oxidação (M)	100 84 29 12	224
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	15495/5,58	49%	4	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.VIEHIMEDLDTNADK.Q Oxidação (M) K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M)	87 89 67 9	253
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	12830/5,80	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	26 13	39
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	13169/5,92	24%	2	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E	37 43	79
<b>S100A9 Protein S100-A9</b>	IPI00027462	13291/5,71	15281/5,90	54%	4	R.NIETIINTFHQYSVK.L K.LGHPDTLNQGEFK.E K.QLSFEEFIMLMAR.L 2 Oxidação (M) K.MHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP.- Oxidação (M)	100 92 31 53	277
<b>SERPIN1 Leukocyte elastase inhibitor</b>	IPI00027444	42829/5,90	41073/6,10	24%	6	K.TFHFNTVEEVHSR.F R.FQSLNADINKR.G K.TYNFLPEFLVSTQK.T	53 4 32	203

						K.TYGADLASVDFQHASEDAR.K	46	
						K.LHEWTKPENLDFIEVNVSLPR.F	15	
						R.FKLEESYTLNSDLAR.L	54	
						K.TFHFNTVEEVHSR.F	53	
						R.FQSLNADINKR.G	4	
						K.TYNFLPEFLVSTQK.T	32	
<b>SERPINB1 Leukocyte elastase inhibitor</b>	IPI00027444	42829/5,90	42464/6,01	24%	6	K.TYGADLASVDFQHASEDAR.K	46	203
						K.LHEWTKPENLDFIEVNVSLPR.F	15	
						R.FKLEESYTLNSDLAR.L	54	
						K.TFHFNTVEEVHSR.F	55	
						R.FQSLNADINKR.G	26	
						K.TYNFLPEFLVSTQK.T	51	
<b>SERPINB1 Leukocyte elastase inhibitor</b>	IPI00027444	42829/5,90	47031/6,08	21%	6	K.TYGADLASVDFQHASEDAR.K	96	351
						K.FAYGYIEDLK.C	42	
						R.FKLEESYTLNSDLAR.L	82	
						R.GDYDAFFEAR.E	85	
<b>SH3BGR1 SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</b>	IPI00025318	12766/5,22	14429/5,16	24%	2	R.ENNAVYAFLGLTAPPGSK.E	71	155
<b>SH3BGR13 Putative uncharacterized protein</b>	IPI00010402	24108/9,27	10618/4,52	8%	2	R.IQYQLVDISQDNALR.D	77	78
						R.IQYQLVDISQDNALRDEM.R.A Oxidação (M)	1	
						K.SQQSEVTR.I	6	
<b>SH3BGR13 Putative uncharacterized protein</b>	IPI00010402	24108/9,27	10618/4,52	11%	3	R.IQYQLVDISQDNALR.D	64	72
						R.IQYQLVDISQDNALRDEM.R.A Oxidação (M)	2	
<b>SH3BGR13 Putative uncharacterized protein</b>	IPI00010402	24108/9,27	9743/4,70	8%	2	R.IQYQLVDISQDNALR.D	71	74
						R.IQYQLVDISQDNALRDEM.R.A Oxidação (M)	3	
<b>SNCA Isoform 1 of Alpha-synuclein</b>	IPI00024107	14451/4.67	16886/4,59	27%	3	K.TKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQK.T	8	114
						K.EQVTNVGGAVVTGVTAVAQK.T	53	
						K.TVEGAGSIAAATGFVK.K	53	
<b>SOD1 Superoxide dismutase</b>	IPI00218733	16154/5.70	17414/5,79	53%	2	K.ESNGPV.K	20	57
						R.HVGD LGNVTAD.K	32	
<b>STMN1 Stathmin 1/oncoprotein 18</b>	IPI00642012	9858/6.75	17414/5,79	43%	2	R.ASGQAFELILSPRS.K	40	71
						K.SHEAEVL.K	28	
<b>TAGLN2 Transgelin-2</b>	IPI00550363	22548/8.41	18981/5,86	34%	2	K.QMEQISQFLQAAER.Y Oxidação (M)	29	87
						R.DDGLFSGDPNWFVK.K	3	
<b>TAGLN2 Transgelin-2</b>	IPI00550363	22548/8,41	20800/5,93	34%	2	K.QMEQISQFLQAAER.Y Oxidação (M)	29	87
						R.DDGLFSGDPNWFVK.K	3	
<b>TALDO1 Transaldolase</b>	IPI00744692	37688/6.36	37850/6,16	6%	2	K.LFVLF GA EILK.K	55	95
						K.LLGELLQDNAK.L	40	
<b>TALDO1 Transaldolase</b>	IPI00744692	37688/6,36	40959/6,02	6%	2	K.LFVLF GA EILK.K	55	95
						K.LLGELLQDNAK.L	40	
<b>TBCA Tubulin-specific chaperone</b>	IPI00217236	12904/5.25	14944/5,16	10%	2	R.RLEAA YLDLQR.I	10	39



	A					R.LEAAYLDLQR.I	30	
<b>TBCA Tubulin-specific chaperone</b>	IPI00217236	12904/5,25	15933/5,22	10%	2	R.RLEAAYLDLQR.I	10	39
	A					R.LEAAYLDLQR.I	30	
						R.IPESGGDNSVFDIFELTGAAR.K	28	
<b>THBS1 Thrombospondin-1 precursor</b>	IPI00296099	133291/4.71	31602/6,52	9%	7	R.IEDANLIPPVPDDKFQDLVDAVR.A	51	258
						K.GFLLASLR.Q	32	
						K.SITLFVQEDR.A	29	
						K.MENAEILDVPIQSVFTR.D Oxidação (M)	11	
						K.GGVNDNFQGVLQNV.R.F	52	
						R.FVFGTTPEDILR.N	55	
						R.IPESGGDNSVFDIFELTGAAR.K	29	
<b>THBS1 Thrombospondin-1 precursor</b>	IPI00296099	133291/4.71	32067/5,59	9%	7	R.IEDANLIPPVPDDKFQDLVDAVR.A	30	196
						K.GFLLASLR.Q	24	
						K.SITLFVQEDR.A	24	
						K.MENAEILDVPIQSVFTR.D Oxidação (M)	8	
						K.GGVNDNFQGVLQNV.R.F	55	
						R.FVFGTTPEDILR.N	26	
						R.KIQVLQQQADDAEER.A	11	
<b>TPM3 Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain</b>	IPI00218319	29243/4.75	31042/4,70	22%	7	K.IQVLQQQADDAEER.A	57	240
						R.EQAEAEVASLNR.R	34	
						R.IQLVEEELDR.A	61	
						K.HIAEEADR.K	13	
						R.KLVIEGDLER.T	48	
						K.LVIEGDLER.T	16	
						R.KIQVLQQQADDAEER.A	45	
<b>TPM3 Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain</b>	IPI00218319	29243/4,75	29162/4,69	19%	5	K.IQVLQQQADDAEER.A	46	155
						R.EQAEAEVASLNR.R	6	
						R.IQLVEEELDR.A	35	
						R.KLVIEGDLER.T	23	
						R.KIQALQQQADEAEDR.A	59	
<b>TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain</b>	IPI00010779	28619/4.67	3080/4,61	22%	6	K.IQALQQQADEAEDR.A	43	350
						R.IQLVEEELDR.A	73	
						R.KLVILEGELER.A	51	
						K.LVILEGELER.A	40	
						K.EENVGLHQTLDQTLNELNCI.-	85	
<b>TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain</b>	IPI00010779	28619/4,67	30000/4,51	14%	5	R.KIQALQQQADEAEDR.A	34	177
						K.IQALQQQADEAEDR.A	21	
						R.IQLVEEELDR.A	63	
						R.KLVILEGELER.A	34	
						K.LVILEGELER.A	26	

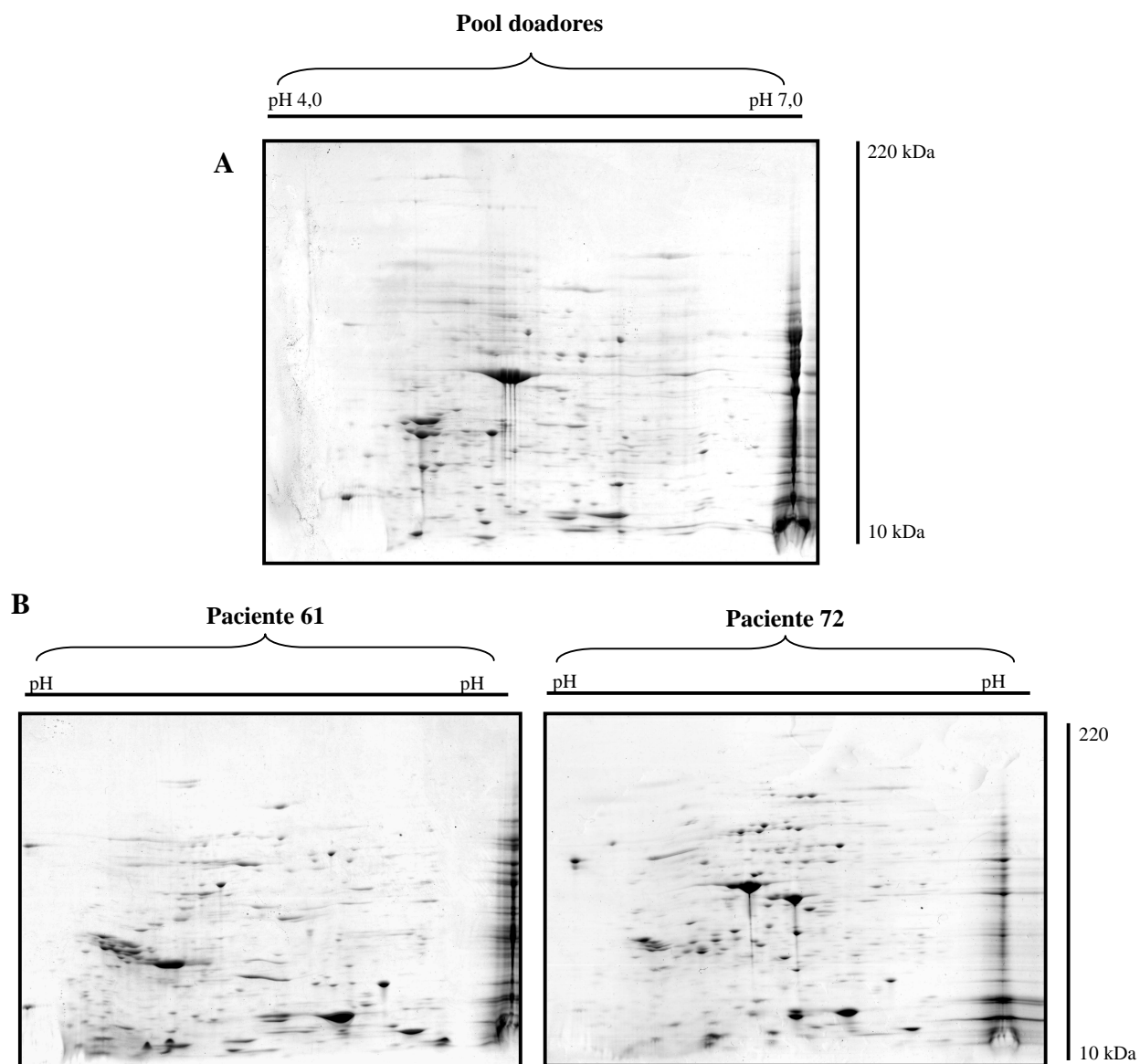
TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	IPI00010779	28619/4,67	25473/4,60	14%	4	K.IQALQQQADEAEDR.A	8	88
						R.IQLVEEELDR.A	32	
TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	IPI00010779	28619/4,67	29869/4,62	14%	5	R.KLVILEGELER.A	24	207
						K.LVILEGELER.A	25	
TTR Transthyretin precursor	IPI00022432	15991/5.52	15540/5,58	24%	2	R.KIQALQQQADEAEDR.A	34	34
						K.IQALQQQADEAEDR.A	50	
TUBA4A Tubulin alpha-4A chain	IPI00007750	50634/4.95	49906/5,47	6%	2	R.IQLVEEELDR.A	56	41
						R.KLVILEGELER.A	48	
TUBB2C Tubulin beta-2C chain	IPI00007752	50255/4.79	50938/4,83	10%	4	K.LVILEGELER.A	19	114
						R.GSPAINVAVHVFR.K	26	
TUBB2C Tubulin beta-2C chain	IPI00007752	50255/4,79	52392/4,71	10%	4	K.ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR.R	8	114
						R.AVFVDLEPTVIDEIR.N	37	
VCL Isoform 1 of Vinculin	IPI00291175	117220/5.83	133055/6,17	8%	5	R.LISQIVSSITASLR.F	4	121
						K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	56	
VCL Isoform 1 of Vinculin	IPI00291175	117220/5,83	87010/5,54	5%	3	R.FPGQLNADLR.K	32	79
						R.YLTVAAVFR.G	23	
VCL Isoform 1 of Vinculin	IPI00291175	117220/5,83	116696/5,67	9%	6	R.ISEQFTAMFR.R Oxidação (M)	2	209
						K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	56	
VIM Vimentin	IPI00418471	53676/5,06	17388/4,41	4%	2	R.FPGQLNADLR.K	32	47
						R.YLTVAAVFR.G	23	
YWHAB Isoform Long of 14-3-3 protein beta/alpha	IPI00216318	28179/4.76	27199/4,71	13%	2	R.ISEQFTAMFR.R Oxidação (M)	2	47
						K.AIPDLTAPVAAVQAAVSNLVR.V	9	
YWHAB Isoform Long of 14-3-3	IPI00216318	28179/4,76	26843/4,74	13%	2	R.GILSGTSDLLLTFDEAEVR.K	38	47
						R.VDQLTAQLADLAAR.G	34	
						R.NPGNQAAAYEHFETMK.N Oxidação (M)	2	
						R.EAFQPQEPDFPPPPDLEQLR.L	39	
						K.AIPDLTAPVAAVQAAVSNLVR.V	6	
						R.GILSGTSDLLLTFDEAEVR.K	49	
						R.VDQLTAQLADLAAR.G	24	
						K.LVQAAQMLQSDPYVSPAR.D Oxidação (M)	26	
						R.GILSGTSDLLLTFDEAEVR.K	65	
						R.VDQLTAQLADLAAR.G	56	
						K.LLAVAATAPPDAPNREEVFDER.A	15	
						R.ELTPQVVSAAR.I	22	
						R.EAFQPQEPDFPPPPDLEQLR.L	27	
						K.ILLAELEQLK.G	9	
						R.KVESLQEEIAFLK.K	40	
						K.AVTEQGHELNSNEER.N	17	
						K.TAFDEAIAELDTLNEESYK.D	31	
						K.AVTEQGHELNSNEER.N	17	

<b>protein beta/alpha</b>						<b>K.TAFDEAIAELDTLNEESYK.D</b>	31	
<b>YWHAB Isoform Long of 14-3-3 protein beta/alpha</b>	IPI00216318	28179/4,76	26902/5,12	18%	3	<b>K.AVTEQGHLSNEER.N</b>	54	
						<b>K.YLIPNATQPESK.V</b>	25	104
						<b>K.TAFDEAIAELDTLNEESYK.D</b>	26	
<b>YWHAE 14-3-3 protein epsilon</b>	IPI00000816	29326/4,63	30343/4,53	11%	2	<b>R.YLAEFATGNDR.K</b>	44	
						<b>K.AAFDDAIAELDTLSEESYK.D</b>	66	110
						<b>K.VAGMDVELTVEER.N</b> Oxidação (M)	2	
<b>YWHAE 14-3-3 protein epsilon</b>	IPI00000816	29326/4,63	26265/4,89	13%	3	<b>R.YLAEFATGNDR.K</b>	30	46
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	14	
						<b>K.SVTEQGAELSNEER.N</b>	103	
						<b>R.DICNDVLSLLEK.F</b>	60	
						<b>K.FLIPNASQAESK.V</b>	41	
<b>YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta</b>	IPI00021263	27899/4,73	26898/4,63	34%	7	<b>K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K</b>	76	447
						<b>K.TAFDEAIAELDTLSEESYK.D</b>	122	
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b>	44	
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	30	
						<b>K.SVTEQGAELSNEER.N</b>	23	
						<b>R.DICNDVLSLLEK.F</b>	17	
<b>YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta</b>	IPI00021263	27899/4,73	26668/4,67	34%	6	<b>K.FLIPNASQAESK.V</b>	9	163
						<b>K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K</b>	66	
						<b>K.TAFDEAIAELDTLSEESYK.D</b>	42	
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	6	
						<b>K.SVTEQGAELSNEER.N</b>	27	
<b>YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta</b>	IPI00021263	27899/4,73	27918/4,66	24%	4	<b>K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K</b>	35	138
						<b>K.TAFDEAIAELDTLSEESYK.D</b>	71	
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	6	
						<b>K.SVTEQGAELSNEER.N</b>	25	
<b>YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta</b>	IPI00021263	27899/4,73	26265/4,89	17%	3	<b>K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K</b>	16	55
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	14	
						<b>K.SVTEQGAELSNEER.N</b>	94	
						<b>K.FLIPNASQAESK.V</b>	47	
<b>YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta</b>	IPI00021263	27899/4,73	26322/4,99	29%	5	<b>K.GIVDQSQQAYQEAFEISK.K</b>	124	400
						<b>K.TAFDEAIAELDTLSEESYK.D</b>	104	
						<b>K.DSTLIMQLLR.D</b> Oxidação (M)	31	

Legenda: IPI – do inglês, *Internacional Protein Index* – Índice internacional de proteínas; PM – peso molecular; PI – ponto isoelétrico

***5.2. Identificação de possíveis biomarcadores de DECHa por análise comparativa entre os padrões bidimensionais das amostras de pacientes com a doença e doadores saudáveis.***

Tendo em vista as dificuldades na comparação de perfis protéicos de cada amostra com DECHa e seu par sem DECHa devido a diferenças de massa de amostra ou de dia da amostra, nós resolvemos inicialmente comparar as proteínas já identificadas com o perfil proteômico de células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis. Portanto, de modo a identificar proteínas possivelmente relacionadas à DECHa, os perfis protéicos obtidos das células mononucleares de sangue periférico das amostras de pacientes foram comparadas com o perfil protéico obtido de um *pool* de células mononucleares de sangue periférico de 20 doadores saudáveis. Estes perfis foram analisados no programa ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Esta análise permite a comparação entre os géis, determinando todos os *spots* em comum entre eles. A figura 28 mostra o perfil protéico dos pacientes 61 e 72 e do pool de doadores.



**Figura 28 – Padrões bidimensionais dos pacientes com DECHa, comparado com pool de doadores saudáveis.** A) Géis 2D com 300  $\mu$ g de extrato total de pool de doadores, resolvidos na janela de análise pH 4-7 e gradiente 8-18%, corados com coomassie blue coloidal. B) Géis 2D com 300  $\mu$ g de extrato total dos pacientes 61 e 72, resolvidos na janela de análise pH 4-7 e gradiente 8-18%, corados com coomassie blue coloidal.

Foram encontradas proteínas com alterações de expressão tanto qualitativas quanto quantitativas entre o perfil de doadores e os pacientes com DECHa. Nós calculamos a intensidade/volume de cada *spot* e comparamos a razão obtida entre os géis. Assim, identificamos 30 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes e doadores, conforme mostra a tabela XIX.

Tabela XIX – Proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECHa e doadores saudáveis.

NOME	IPI	PM/PI (teórico)	PM/PI (experimental)	Score	D	P	Relação paciente/doador
ACTB Actin, cytoplasmic 1	<a href="#">IPI00021439</a>	42052/5.29	32224/4,74	253	S	S	Diminuído
ACTR3 Actin-related protein 3	<a href="#">IPI00028091</a>	47797/5,61	59003/5,79	177	N	S	Aumentado
ANXA3 Annexin A3	<a href="#">IPI00024095</a>	36524/5.63	34501/5,61	226	S	S	Aumentado
ANXA6 annexin VI isoform 2	<a href="#">IPI00002459</a>	75571/5.46	36048/6,49	99	S	S	Aumentado
ARHGDI Rho GDP-dissociation inhibitor 1	<a href="#">IPI00003815</a>	23250/5,02	29098/4,93	127	S	S	Aumentado
ARHGDI Rho GDP-dissociation inhibitor 2	<a href="#">IPI00003817</a>	23031/5.10	27688/5,06	167	S	S	Aumentado
ATP5B ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	<a href="#">IPI00303476</a>	56525/5.26	55075/4,98	299	S	S	Diminuído
CALR Calreticulin precursor	<a href="#">IPI00020599</a>	48283/4.29	67070/4,19	327	N	S	Ausente D
CAPZA1 F-actin-capping protein subunit alpha-1	<a href="#">IPI00005969</a>	33073/5.45	36283/5,5	141	S	S	Aumentado
ERP29 Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	<a href="#">IPI00024911</a>	29032/6.77	26188/5,87	254	S	N	Ausente P
FLNA filamin A, alpha isoform 1	<a href="#">IPI00302592</a>	282581/5.69	90890/5,71	78	S	S	Diminuído
GRB2 Isoform 1 of Growth factor receptor-bound protein 2	<a href="#">IPI00021327</a>	25304/5.89	25554/6,09	62	S	S	Aumentado
HSPA5 HSPA5 protein	<a href="#">IPI00003362</a>	72492/5,07	81695/4,90	144	S	S	Aumentado
HSPB1 Heat shock protein beta-1	<a href="#">IPI00025512</a>	22826/5.98	22507/5,38	108	S	S	Aumentado
HSPD1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	<a href="#">IPI00784154</a>	61187/5.70	62845/5,28	51	S	S	Diminuído
LCP1 Plastin-2	<a href="#">IPI00010471</a>	70815/5.20	71604/5,19	294	S	S	Aumentado
LGALS1 Galectin-1	<a href="#">IPI00219219</a>	15048/5.34	14179/4,99	364	S	S	Diminuído
NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin	<a href="#">IPI00220740</a>	29617/4.47	17227/4,27	81	S	S	Aumentado
P4HB Protein disulfide-isomerase precursor	<a href="#">IPI00010796</a>	57480/4.76	67445/4,72	428	S	S	Aumentado
PARK7 Protein DJ-1	<a href="#">IPI00298547</a>	20050/6.33	22657/6,35	160	S	S	Diminuído
PGLS 6-phosphogluconolactonase	<a href="#">IPI00029997</a>	27815/5.70	31042/5,99	36	S	S	Diminuído
S100A12 Protein S100-A12	<a href="#">IPI00218131</a>	10569/5.83	9651/6,25	69	S	S	Aumentado
S100A9 Protein S100-A9	<a href="#">IPI00027462</a>	13291/5,71	12140/5,90	93	S	S	Aumentado
SERPIN1 Leukocyte elastase inhibitor	<a href="#">IPI00027444</a>	42829/5.90	41073/6,10	203	S	S	Aumentado
SNCA Isoform 1 of Alpha-synuclein	<a href="#">IPI00024107</a>	14451/4.67	16886/4,59	114	S	N	Ausente P
TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	<a href="#">IPI00010779</a>	28619/4.67	3080/4,61	350	S	S	Diminuído
TUBB2C Tubulin beta-2C chain	<a href="#">IPI00007752</a>	50255/4.79	50938/4,83	114	S	S	Aumentado
VCL Isoform 1 of Vinculin	<a href="#">IPI00291175</a>	117220/5.83	133055/6,17	121	S	S	Aumentado
YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	<a href="#">IPI00021263</a>	27899/4.73	26898/4,63	447	S	S	Diminuído

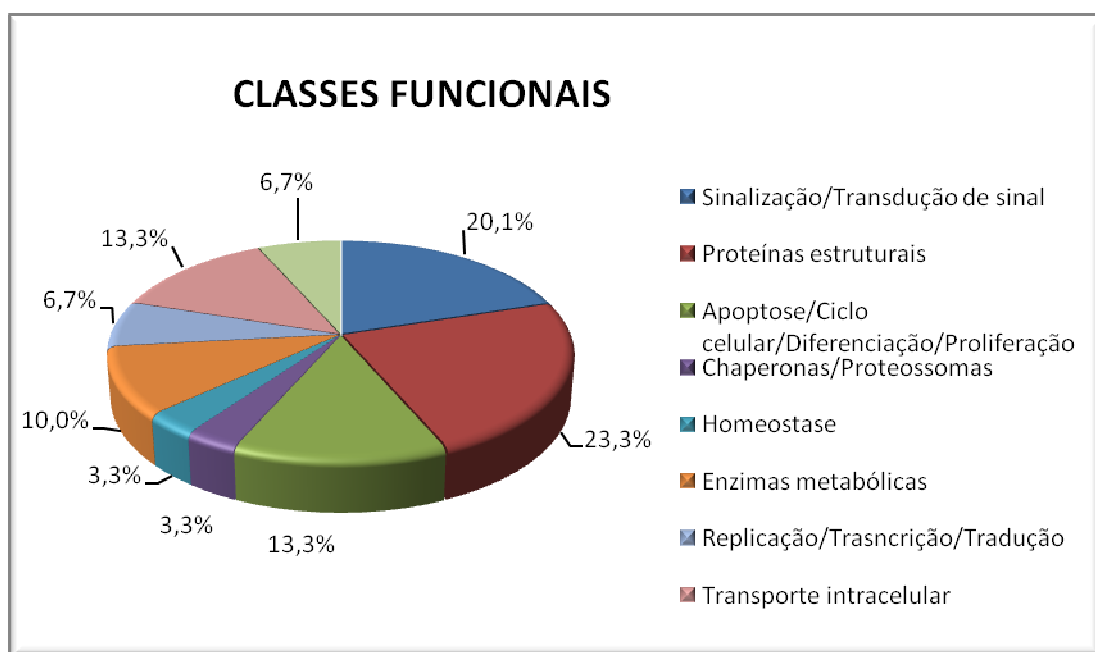
Legenda: IPI – do inglês, *Internacional Protein Index* – Índice internacional de proteínas; PM – peso molecular; PI – ponto isoelétrico; D – presente no doador; P – presente no paciente; S – sim; N – não; Ausente P – ausente no paciente; Ausente D – ausente no doador.

Das proteínas diferenciamente expressas entre pacientes e doadores, algumas são proteínas estruturais da célula, enquanto outras participam de diversas vias de sinalização, desempenhando diferentes funções nas células. Sendo assim, o próximo passo foi realizar uma análise *in silico* destas proteínas, a fim de encontrar proteínas potenciais que pudessem ser utilizadas como marcadores da DECHa.

### **5.3. Análise *in silico* das proteínas identificadas**

#### **5.3.1. Categorização funcional das proteínas identificadas**

A partir das proteínas identificadas foram realizadas análises, nos diversos bancos de dados, em busca de informações sobre as funções das mesmas (por dados de ontologia de genes) ou qualquer outra informação (como domínios, sítios funcionais, famílias pertencentes, homologia e localização celular) a partir da qual pudéssemos inferir ou prever alguma função. Assim, podemos verificar na figura 29, a categorização das proteínas diferencialmente expressas entre amostras de doadores saudáveis e pacientes com DECHa.



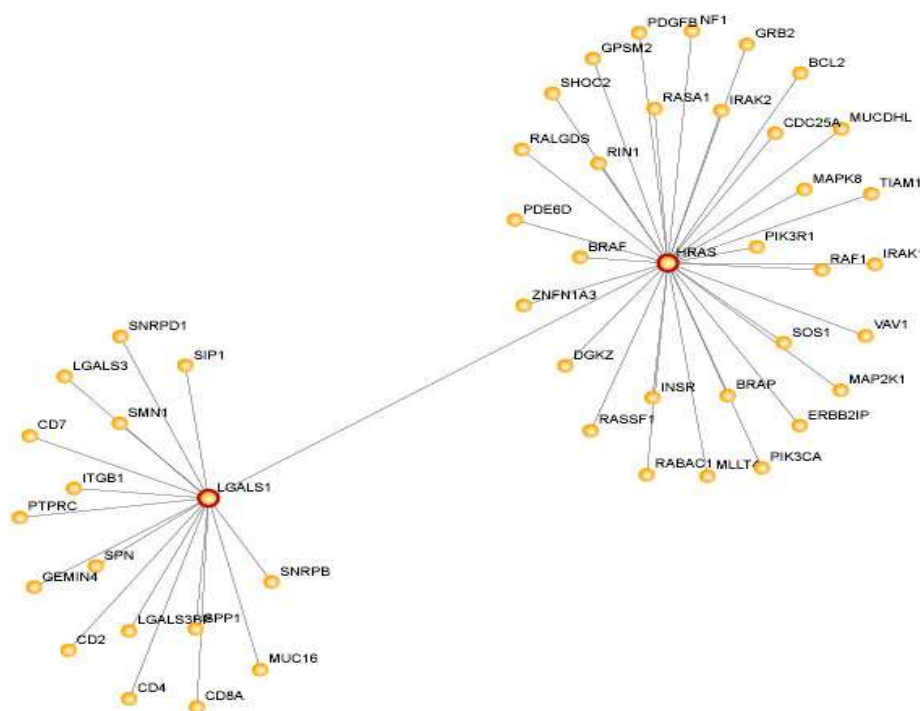
**Figura 29 - Distribuição das proteínas diferencialmente expressas, identificadas por espectrometria de massas em classes de função.**

A partir da definição das categorias funcionais das proteínas diferencialmente expressas entre paciente e doadores, nós iniciamos uma análise das interações moleculares destas proteínas com outras que já são conhecidas por atuarem na DECHa.

### 5.3.2. Predição de interações moleculares das proteínas diferencialmente expressas identificadas.

A fim de se verificar os prováveis parceiros, direta e/ou indiretamente, das proteínas identificadas como diferencialmente expressas, foi feita a análise do interatoma das mesmas através do banco de dados do *Human Interactome Map (HiMAP)*. O HiMAP é um navegador online (<http://www.himap.org/index.jsp>) que permite a exploração de interações protéicas conhecidas e preditas. As interações conhecidas consistem em interações descritas na literatura (Base de dados de referência protéica humana) (Rual *et al.*, 2005; Stelzl *et al.*, 2005). Já as interações preditas são geradas por uma análise *Bayesiana*, publicada na *Nature Biotechnology* (Rhodes *et al.*, 2005).

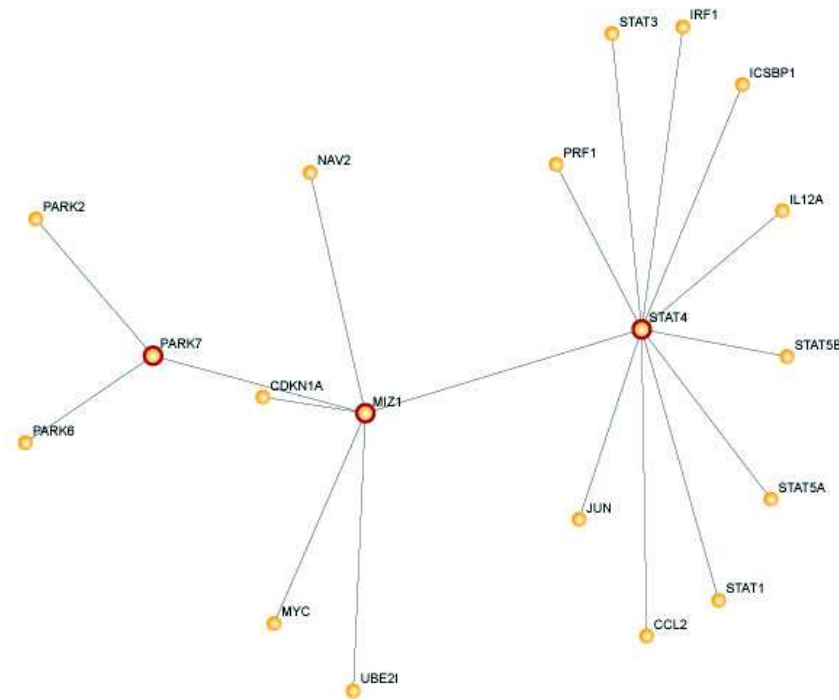
A partir desta análise, algumas proteínas diferencialmente expressas em pacientes com DECHA surgiram como possíveis candidatos a biomarcadores da doença. Entre eles podemos destacar as proteínas LGALS1, PARK7, CALR e YWHAZ. Como todas elas estavam diferencialmente expressas em pacientes com DECHA (LGAL1, PARK7 e YWHAZ diminuídas; CARL aumentada). Os interatomas das proteínas escolhidas podem ser visualizados das figuras 30 a 33.



**Figura 30 - Mapa de interação da proteína Galectina 1 (LGALS1).**



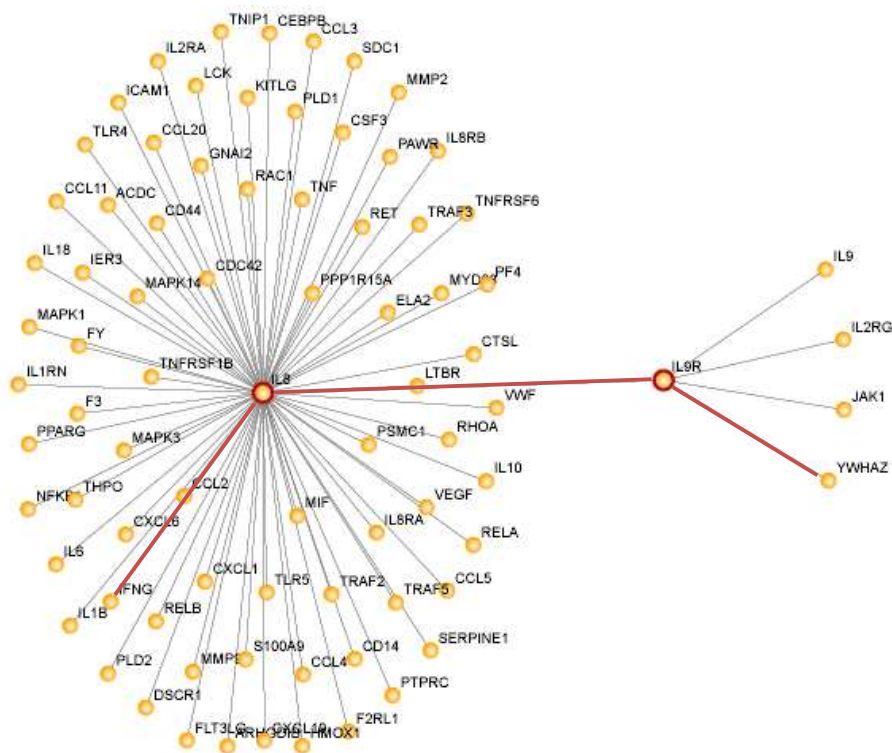
O interatoma de LGALS1 mostra as interações descritas e previstas desta proteína. Nele se encontra evidenciado sua relação com a proteína HRAS. A participação da proteína Galectina na DECHa foi assinalada por Fändrich e colaboradores (Fändrich *et al.*, 1998). Ela seria responsável por prevenir a DECH, diminuindo a quantidade de células T ativas e aumentando as células T regulatórias.



**Figura 31 - Mapa de interação da proteína DJ-1 (PARK7).**

O interatoma da proteína DJ-1 mostra suas interações descritas e previstas. Nele se encontra evidenciada sua relação com a proteína MIZ1 (Myc-interacting zinc-finger protein 1), um fator de transcrição que suprime seletivamente a ativação de JNK1 (c-Jun N-terminal kinase, ou stress-activated protein kinase), um membro da superfamília de MAPK, induzida por TNF- $\alpha$  (Liu *et al.*, 2009). A PARK7 é uma proteína relacionada com a doença de Parkinson, que desempenha papel de fator de transcrição e anti-estresse oxidativo (Hayashi *et al.*, 2009). Não há correlação desta proteína com a DECHa na literatura, porém ela se encontra muito diminuída nos pacientes com a doença (razão/volume > 3,5).





**Figura 33 – Mapa de interação da proteína 14-3-3ζ (YWHAZ).**

O interatoma da proteína 14-3-3ζ mostra suas interações descritas e previstas. A proteína 14-3-3ζ é pertencente a família das proteínas 14-3-3. As proteínas desta família estão envolvidas em diversos processos, incluído regulação do ciclo celular, apoptose, controle de metabolismo e controle da expressão gênica (Obšilová *et al.*, 2008). O interatoma apresentado mostra interação da proteína com IFN-γ, através da interação com IL9R e IL8 (Luker *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2004; Tamai *et al.*, 2002). A partir da interação com IL-8, ocorre a interação com diversas outras citocinas e quimiocinas.

Com a análise proteômica podemos sugerir que proteínas não relacionadas diretamente com o processo inflamatório podem atuar como biomarcadores da DECHA. Porém, mais estudos são necessários para verificarmos outras proteínas relacionadas com a doença.

## *DISCUSSÃO*

Atualmente, o diagnóstico da DECHa é baseado principalmente em parâmetros clínicos-laboratoriais, tais como erupções na pele, diarreia, elevação dos níveis séricos de enzimas hepáticas, entre outros sintomas (Przepiorka *et al.*, 1995). O diagnóstico diferencial depende de biópsias de órgãos para distinguir a DECHa de outras complicações comuns que se apresentam com sintomas clínicos semelhantes (por exemplo, a reativação de vírus endógenos ou efeitos secundários induzidos por medicação). O uso de biomarcadores diferencialmente expressos ou proteínas secretadas podem ter potencial para melhorar o diagnóstico precoce e preciso da DECHa e outras complicações do TCTH, sem a necessidade de procedimentos invasivos, tais como biópsias (Liotta *et al.*, 2003).

Algumas moléculas são atualmente descritas como potenciais marcadores da DECHa. Devido à falta de tecnologia adequada, a busca por proteínas envolvidas na DECHa até agora tem sido naturalmente influenciado pela análise preferencial de moléculas conhecidas, com potencial importância fisiopatológica. Algumas citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5 aparecem na literatura como potenciais marcadores da DECHa, assim como as quimiocinas IL8 e IP-10, juntamente com seu receptor CXCR3 (Fujji *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2007). Outros marcadores de DECHa que frequentemente são cogitadas são populações celulares, principalmente no que diz respeito à células T regulatórias e células apresentadoras de antígenos.

Apesar de vários relatos na literatura, grande parte deste conhecimento está relacionado a DECHa em modelos animais, enquanto em humanos os dados são poucos e muitas vezes controversos. Outro aspecto desta doença em humanos é que as variáveis clínicas influenciam diretamente no risco de desenvolver DECHa. Já é sabido que a incompatibilidade de HLA aumenta o risco de desenvolver a doença, assim como idade avançada do receptor, parentesco, disparidade entre sexo do doador e receptor (receptor masculino e doadora feminina) e regime de condicionamento.

Neste estudo nós acompanhamos 100 pacientes submetidos ao TCTH de modo a identificar fatores que pudessem estar correlacionados com o aparecimento da DECHa. Nós estudamos tanto variáveis clínicas que pudessem influenciar na doença, quanto parâmetros moleculares e celulares envolvidos na patogenia da doença. Nós utilizamos diversas abordagens para tentar identificar moléculas como potenciais marcadoras da DECHa, principalmente se pudessem prever precocemente o risco de desenvolvimento da DECHa. Entretanto, inicialmente nós investigamos a relação das diversas variáveis clínicas com o surgimento da doença.

Segundo a literatura, a prevalência de DECHa está diretamente relacionada à incompatibilidade de HLA. A doença ocorre em cerca de 35-45% dos pacientes que receberam células de doadores compatíveis (Loiseau *et al.*, 2007; Ratanatharathorn *et al.*, 1998), e cerca de 60-80% em pessoas que recebem pelo menos um antígeno de doadores HLA-mismatched não relacionados (Flomenberg *et al.*, 2004; Petersdorf *et al.*, 1995; Anasetti *et al.*, 1989). Quando a fonte de células é SCUP, mesmo 1 incompatibilidade de HLA não implica necessariamente na ocorrência de DECHa, ou seja, há uma diminuição da ocorrência de DECHa quando a fonte de células é SCUP (Barker & Wagner, 2003). Os pacientes que recebem SCUP têm menos chance de desenvolver DECHa que os pacientes que recebem células da MO e SPM, respectivamente (Kumar *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a correlação do aparecimento da DECHa em pacientes de acordo com as diferentes variáveis clínicas apresentaram diferenças significativas quando comparados a ocorrência de DECHa e a compatibilidade HLA, e a ocorrência de DECHa e a relação dos doadores. Também encontramos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a ocorrência de DECHa de pele e diferentes fontes de células ou o estágio da doença de base, e a ocorrência de DECHa de TGI e idade dos pacientes. Essas relações de parentesco e idade dos doadores são os mesmos encontrados na literatura (Jacobsohn, 2008; Johnston, 2008; Jourdan *et al.*, 2005). No entanto, encontramos algumas diferenças quando comparamos com os dados encontrados na literatura, no caso de compatibilidade HLA (completo x incompleto) (Loiseau *et al.*, 2007; Petersdorf *et al.*, 1995) e fonte de células (MO x SP) (Johnston, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

Em relação à compatibilidade de HLA, nossa coorte possui 12 pacientes que receberam transplante com pelo menos 1 incompatibilidade de HLA e 88 pacientes que receberam transplante com compatibilidade total de HLA. Surpreendentemente, apenas 16,67% do grupo que possui incompatibilidade de HLA desenvolveu DECHa, enquanto no grupo HLA completo 60,23% apresentaram a doença. No grupo HLA incompleto, esta diferença ocorreu provavelmente porque desses 12 pacientes com HLA incompatível, 7 pacientes receberam transplante de células originadas de SCUP (1 doador relacionado e 6 doadores não relacionados), e dos 5 pacientes restantes, 2 pacientes morreram antes do D+28, ou seja, não tiveram tempo para desenvolver a doença. Isso explica a baixa incidência de DECHa neste grupo, já que, segundo a

literatura, o uso da SCUP no transplante acarreta em uma menor incidência de DECHa (Kumar *et al.*, 2008).

No entanto, no grupo HLA completo, 53 pacientes desenvolveram DECHa, representando quase 100% dos casos de DECHa. Quando analisamos este grupo de acordo com o estado da doença de base, houve uma menor prevalência de DECHa no grupo DNM (doenças não malignas), e a maior incidência de DECHa ocorreu em pacientes com neoplasias em estado avançado. Além disso, 64,1% desses 53 pacientes receberam células de MO, 33,9% receberam células de SPM, e somente 1 paciente recebeu células de sangue SCUP (2%). Juntos, estes resultados indicam que não somente o HLA influencia para a incidência de DECHa, mas também o estágio da doença de base e a fonte de células utilizadas para o transplante são importantes para calcular o risco de DECHa.

Quando estes pacientes foram divididos de acordo com o órgão afetado pela doença, houve uma maior incidência de DECHa de pele no grupo DMA (doenças malignas avançadas) do que no grupo LM (linfomas e mielomas). Não houve diferença significativa para outros grupos de doenças. Encontramos também diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a ocorrência de DECHa de pele e as fontes de células utilizadas. A fonte de células utilizada na maioria destes pacientes foi de MO, e de acordo com a literatura, a prevalência de ocorrência de DECHa nos pacientes que recebem células da MO ou SP é a mesma (Kumar *et al.*, 2008).

Nós também observamos uma prevalência maior de DECHa do trato gastrointestinal em pacientes mais velhos do que em pacientes mais novos. Neste caso, a idade influencia diretamente na ocorrência da DECHa de TGI.

A sobrevida global dos nossos pacientes foi de 58,6% nos 3 anos de acompanhamento. Quando nós separamos esses pacientes de acordo com a gravidade da doença de base, observou-se que a sobrevida global dos pacientes diminui de acordo com a gravidade da doença. Estes dados estão em conformidade com os dados do National Marrow Donor Program (NMDP) que mostra uma OS de 63,5% para o grupo DMP (cerca de 65% para todos e 62% para a LMA em primeira remissão) no primeiro ano após o transplante, 41,5% para o grupo DMA, de 60% e 55% para os grupos DNM e LM, respectivamente. Todos esses OS se referem a indivíduos com mais de 18 anos. Em nossa análise, quando os casos foram separados por idade e doença de base, todas as OS encontradas foram semelhantes aos dados da NMDP (dados não mostrados). Nós não encontramos diferenças significativas entre as OS ao dividir os pacientes que

desenvolveram DECHa ou não, mostrando que, apesar da alta incidência de DECHa em nosso grupo, esta incidência não foi significativa para a mortalidade.

Uma vez que identificamos quais variáveis clínicas estavam influenciando diretamente o aparecimento da DECHa, nós passamos a analisar os parâmetros moleculares e celulares, associando a estas variáveis clínicas. Segundo a literatura, em modelos animais, citocinas e quimiocinas estão diretamente relacionados com a DECHa, uma vez que esta é uma doença inflamatória (Wysocki *et al.*, 2005). O estudo de moléculas que possam estar influenciando na doença sempre foi voltado à procura de moléculas envolvidas no processo de inflamação. Sendo assim, nós iniciamos este estudo também procurando o envolvimento destas moléculas inflamatórias no papel da doença.

Nós observamos que os níveis séricos de algumas citocinas e quimiocinas estão correlacionados com a ocorrência de DECHa após o transplante alogênico. Nossos resultados mostraram que a concentração plasmática de IFN- $\gamma$  está elevada em pacientes com DECHa no D+14, sugerindo que esta molécula pode ser um marcador precoce da doença. Observamos também um aumento de IL-5 e MCP-1 em pacientes com DECHa que receberam condicionamento mieloablativo. E, finalmente, quando separamos esses pacientes de acordo com o órgão afetado pela DECHa, descobrimos que o IFN- $\gamma$  está fortemente associado com a ocorrência de DECHa de pele no D+14, mas quando avaliamos esta citocina em biópsias de pele, não encontramos diferenças entre os pacientes que desenvolveram a doença ou não. Além disso, o aumento da concentração plasmática da quimiocina IL-8 no D+14 está associado com o aparecimento de DECHa de TGI

INF- $\gamma$  é uma citocina liberada em resposta ao regime de condicionamento realizado para o transplante, causando a destruição de tecidos. Imamura e colaboradores mostraram que os níveis séricos de INF- $\gamma$  em pacientes com DECHa aumentaram com menos de 14 dias após o início da doença e que era rapidamente reduzido com a regressão da mesma (Imamura *et al.*, 1994).

A fim de definir um ponto de corte acima do qual podemos identificar aqueles pacientes em risco, foi utilizada a mediana de cada citocina encontrada no D-8. Esta medida mostrou-se útil em 68,2% dos pacientes que possuíam INF- $\gamma$  superior a 12,75 pg/ml no D+14 e que desenvolveram algum grau de DECHa. Apesar disto, 31,8% dos pacientes que apresentaram INF- $\gamma$  abaixo do ponto de corte tiveram DECHa.



Observamos também que o aumento de INF- $\gamma$  no soro foi associado com um regime mieloablativo. Neste caso, 77,4% dos pacientes que tiveram INF- $\gamma$  superior a 12,75 pg/ml desenvolveram DECHa. Além disso, também encontramos associação entre a IL-5 e DECHa em pacientes que receberam um condicionamento mieloablativo. Pacientes que desenvolveram DECHa depois de receber condicionamento mieloablativo e possuíam níveis séricos de IL-5 maiores que 4,70 pg/ml no D+14 representam 65,8% dos casos.

É bem sabido que a IL-5 é uma citocina essencial para o crescimento e diferenciação de eosinófilos (Fujii *et al.*, 2006). Outros estudos demonstraram associação entre eosinofilia, IL-5 e ocorrência de DECH aguda e crônica (Imoto *et al.*, 2000; Daneshpouy *et al.*, 2002). Daneshpouy e colaboradores demonstraram que quando os pacientes apresentavam sinais de DECHa em biópsias do trato gastrointestinal, eosinófilos estavam presentes nessas biópsias e IL-5 estava presente em eosinófilos ativados, sugerindo um mecanismo autócrino (Daneshpouy *et al.*, 2002). Por outro lado, Imoto e colaboradores mostraram que a concentração plasmática de IL-5 é maior que 100 pg/ml em pacientes com DECHa durante o surto da doença, indicando que, neste momento, o órgão afetado produz altos níveis de IL-5 (Imoto *et al.*, 2000).

Em nosso trabalho, não pudemos verificar a relação de IL-5 e DECHa de TGI provavelmente devido ao número reduzido de pacientes com DECHa de TGI. Por outro lado, níveis séricos elevados de IL-5 mostraram-se associados com pacientes acima de 18 anos de idade. DECHa de TGI já foi correlacionado com pacientes mais velhos (Daneshpouy *et al.*, 2002). Além disso, vimos que o risco de DECHa de TGI está associado a pacientes acima de 18 anos de idade. Assim, a associação da idade e IL-5 em nossos pacientes pode ser consequência de um maior risco de DECHa de TGI.

Um ponto relevante é que, embora os dois marcadores estejam significativamente mais elevados no D+14 em pacientes submetidos a um regime mieloablativo, eles são independentes um do outro. Enquanto INF- $\gamma$  pode ser usado como um biomarcador plasmático precoce para DECHa de pele em pacientes submetidos à mieloablação, IL-5 tem um uso mais restrito: pacientes acima de 18 anos de idade que foram submetidos a mieloablação.

Esta medida foi extremamente importante para defenir o risco de desenvolver DECHa. Diversos estudos no decorrer dos anos vêm demonstrando a importância do INF- $\gamma$  e da participação do IL-5 no desenvolvimento da DECHa. Porém, nenhum destes

estudos mostrou uma quantificação desta molécula que pudesse ser aplicada na clínica médica como preditor de risco de desenvolvimento de DECHa. Neste estudo, nós vimos que pacientes que possuem um aumento da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  e IL-5 no D+14 acima da mediana encontrada no D-8 destes mesmos pacientes tem um risco aumentado de desenvolver DECHa, e esta quantificação pode ser levada para a clínica de modo a investigar se os pacientes com IFN- $\gamma$  e IL-5 elevados no D+14 vão desenvolver DECHa.

Já as quimiocinas inflamatórias são moléculas que tem como função promover a migração dos leucócitos para os sítios de inflamação. São produzidas por macrófagos e células epiteliais em resposta à citocinas proinflamatórias, como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-1.

Alguns estudos mostram relação entre algumas quimiocinas e DECHa. Hori e colaboradores mostraram através de tecnologia proteômica que camundongos com DECHa possuem altos níveis de IL-8 no plasma (Hori *et al.*, 2008). Já Piper e colaboradores analisaram 9 citocinas e 6 quimiocinas diferentes, e encontraram apenas diferenças significativas de IP-10 e no seu receptor CXCR3 em biópsias de pele (Piper *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram a participação de outras quimiocinas, porém a maioria destes estudos foi realizada em modelo animal.

Em nosso estudo, analisamos 4 quimiocinas e vimos que 3 delas encontram-se alteradas no plasma de pacientes com DECHa. Vimos que o aumento de MCP-1 está relacionado com o surgimento da doença em pacientes que receberam regime de condicionamento mieloablativo. O aumento da concentração plasmática de IL-8 está relacionada com o surgimento da DECHa de TGI.

Esta relação foi obtida a partir do estabelecimento de um ponto de corte para as quimiocinas, da mesma forma que fizemos com as citocinas. Nós encontramos a mediana no D-8 de cada quimiocina e estabelecemos esta medida como o nosso ponto de corte. Nós observamos que o aumento da concentração plasmática de MCP-1 acima de 175 pg/ml, e de IL-8 acima de 26 pg/ml podem predizer o risco de ocorrer DECHa no D+14.

Surpreendentemente, analisando a quimiocina IP-10, vimos que o aumento desta molécula no D+14 diminui o risco do paciente desenvolver DECHa. A quimiocina IP-10 é induzida pelo aumento de INF- $\gamma$ . Apesar de IP-10 ser considerado uma quimiocina inflamatória, estudos recentes com doenças autoimunes vem mostrando que esta

molécula tem efeitos pleiotrópicos, com efeitos antagonistas (Lee *et al.*, 2009). Por isso são necessários mais estudos com esta molécula para verificar seu verdadeiro papel.

Uma vez que estas moléculas inflamatórias são liberadas por células ativadas do sistema imune, outro ponto importante na nossa investigação foi a relação do aumento ou diminuição destas populações celulares com o risco de desenvolver DECHa. Como falamos anteriormente, a DECHa é uma doença mediada por fatores imunológicos, resultante de uma complexa interação entre a imunidade adaptativa do doador e receptor. Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> derivadas do doador têm sido classicamente consideradas as principais células efetoras que medeiam a patogênese da DECHa. De fato, a remoção de células T de enxertos transplantados em pacientes previne o desenvolvimento de DECHa, porém aumenta a incidência de rejeição do enxerto e recidiva da doença (Ho e Soiffer, 2001). Nos últimos anos, pesquisas básica e clínica têm fornecido uma compreensão mais detalhada das moléculas e os tipos de células envolvidas na biologia da DECHa.

Em nosso estudo vimos que ocorre uma diminuição logo no início do acompanhamento de todas as populações celulares, fato que ocorre devido ao regime de condicionamento. Após o D+14, as populações celulares vão lentamente recuperando-se. Nós não encontramos diferenças estatisticamente significativas que possam correlacionar o aumento de linfócitos T com o aparecimento da DECHa. Mas, nós observamos que a diminuição de linfócitos B no D+45 está associado a um maior risco de DECHa. Além disso, observamos também que quando realizamos uma razão entre células NK/linfócitos B, esta relação diminui entre os dias 14 e 45 nos pacientes que não desenvolveram DECHa e aumenta nos pacientes que desenvolveram a doença, e esse aumento coincide com um maior risco de desenvolver DECHa no D+45.

As células B são células centrais da resposta imune humoral. Elas são especializadas na produção de anticorpos para proporcionar uma defesa contra as bactérias, vírus e antígenos protéicos nocivos, como as toxinas. Na última década, essa visão, que incidiu sobre a importância das células B para a resposta imune humoral, mudou radicalmente. Evidências sugerem que além das células B serem células de produção de anticorpos, elas também participam de mecanismos importantes independentes desta produção, como a apresentação de antígenos e a produção de citocinas e quimiocinas (von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2000). As células B podem, portanto, configurar o tipo e a força da resposta do sistema imune pela ativação e recrutamento de outras células do sistema imunológico. Por exemplo,

análoga à subpopulações de células T efectoras CD4<sup>+</sup>, Harris e colaboradores identificaram dois subtipos celulares B distintos, denominado células B efectoras 1 (BE1) e células B efectoras 2 (Be2), que regulam diferencialmente respostas de células T pela produção de diferentes conjuntos de citocinas (Harris *et al.*, 2000).

Já as células NK são células especializadas do sistema imune inato e suas funções efectoras são dependentes de perforina e IFN- $\gamma$  (Moretta *et al.*, 2009). Essas células atuam reconhecendo antígenos através de seus receptores KIR, e no transplante, paciente e doador que possuem compatibilidade de HLA não necessariamente possuem compatibilidade KIR. Por outro lado, diversos estudos vêm mostrando que as células NK parecem ajudar na “pega” do transplante, reduzem a incidência de DECH e diminuem a recaída das doenças de base (Moretta *et al.*, 2009).

Nós observamos que a relação NK/B diminui nos pacientes que não desenvolvem a doença e aumenta nos pacientes que desenvolvem DECHa entre os dias +14 e +45. Uma hipótese para isto é que com o estabelecimento da doença, ocorre uma diminuição de linfócitos B. Com esta diminuição, diminui a quantidade de IL-10 liberada e, como conseqüência, ocorre o aumento das células NK para que o sistema imunológico tente conter o avanço da DECHa.

Além de células T e B, outra população que parece estar associada diretamente com a ocorrência de DECHa é a população de células T regulatórias. As células T regulatórias são uma subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que marca positivamente para CD25<sup>+</sup> e FoxP3<sup>+</sup> (Sakaguchi *et al.*, 2007). Estas células têm sido relatadas como associadas com a ocorrência de DECHa. A depleção desta subpopulação em camundongos acelera a ocorrência de DECHa (Salomon *et al.*, 2006). Nós não analisamos diretamente esta população celular, mas analisamos a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, onde estão contidas as células T regulatórias. Nós não encontramos nenhuma relação estatística em nossa população de estudo com o aumento ou diminuição das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Porém, mais estudos precisam ser realizados com essa população celular, inclusive o estudo utilizando FoxP3, para certificar que se trata realmente da população de células T regulatórias. Pretendemos, portanto, continuar com o estudo destas populações, além de estudar outras populações tais como células T ativadas e populações de células dendríticas.

Conforme dito no decorrer desta discussão, muitos estudos procurando potenciais biomarcadores da DECHa tem sido realizados. Recentemente, alguns estudos utilizando tecnologia proteômica de diversos fluídos corporais vêm sendo utilizados

para tentar encontrar moléculas associadas com o início da DECHa (Paczesny *et al.*, 2009; Weissinger *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2006).

Análise proteômica tem sido empregada a fim de caracterizar e identificar moléculas importantes para as diferentes doenças, possibilitando a identificação precoce de biomarcadores. Uma técnica que permite reprodutibilidade e a análise de todos os polipeptídeos presentes em amostras biológicas complexas dentro de um prazo relativamente curto é a análise por gel bidimensional e espectrometria de massas (MS-MS). Através da tecnologia proteômica, com gel bidimensional, é possível verificar as proteínas expressas no momento da sua extração.

Nós analisamos amostras de células mononucleares de sangue periférico de 15 pacientes com DECHa pela tecnologia de gel 2D/espectrometria de massas. O perfil protéico destes pacientes varia muito, uma vez que estes pacientes possuíam diferentes doenças de base e receberam diferentes tipos de condicionamento. No entanto, identificamos todas as proteínas encontradas nas células dos pacientes e comparando com o perfil proteômico de células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis foi possível identificar 30 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes e doadores. Esta foi a primeira análise proteômica realizada com células mononucleares de sangue periférico em pacientes com DECHa, uma vez que na literatura existem algumas análises proteômicas de fluídos de pacientes com DECHa. Análises com urina e plasma de pacientes com DECHa já foram realizadas, porém essas análises foram pouco elucidativas (Paczesny *et al.*, 2009; Weissinger *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2006; Kaiser *et al.*, 2004).

Algumas destas proteínas que estavam alteradas, tais como actina, tubulina, vinculina, participam da estruturação celular. Isso indica que células mononucleares de pacientes com DECHa perdem a estruturação celular, alterando a forma da célula. No entanto, outras proteínas diferencialmente expressas se destacam como possíveis candidatas a terem um papel no desenvolvimento da DECHa, como as proteínas galectina-1, proteína DJ-1, calreticulina e proteína 14-3-3ζ.

A galectina-1 é uma proteína que pertence à família das galectinas, proteínas que possuem alta afinidade por beta-galactosídeos. Estas proteínas possuem uma sequência conservada de domínios que se ligam a carboidratos (CRB) (Leffler *et al.*, 2004). As galectinas estão envolvidas na regulação da função dos leucócitos (Stowell *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram que a Gal-1 exibiu potente atividade imunossupressora adaptativa *in vivo* (Baum *et al.*, 2003; Santucci *et al.*, 2003; Santucci

*et al.*, 2000). Outros estudos sugerem que a Gal-1 pode modular o sistema imunológico pela indução de apoptose em células T ativadas (Perillo *et al.*, 1995).

Os efeitos *in vivo* de Gal-1 podem ser resultados de alterações na expressão de IL-10 e IFN- $\gamma$  em células T, alterando diretamente a viabilidade das células T. IL-10 apresenta potente atividade imunossupressora, inibindo a ativação de células T e a secreção de citocinas Th1, e diminuindo receptores de co-estimulação em APCs (Moore *et al.*, 1993; de Waal Malefyt *et al.*, 1991). A capacidade de Gal-1 para induzir a produção de IL-10, uma citocina chave envolvidas na função de células T reguladoras (Stowell *et al.*, 2008), pode refletir mecanismos que permitam células T reguladoras suprimir o sistema imune *in vivo*. Curiosamente, os primeiros estudos demonstrando que Gal-1 suprime a imunidade adaptativa sugerem um papel supressor para células T (Stowell *et al.*, 2008). Estes estudos, portanto, sugerem que Gal-1 suprime as respostas imunes adaptativas, alterando a produção de citocinas sem afetar diretamente a viabilidade das células T.

Vários estudos vêm demonstrando a relação entre DECHa e galectina-1, principalmente no que diz respeito a células mesenquimais. Células mesenquimais são células tronco multipotentes, originadas na medula óssea e capazes de se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em tecidos de origem mesenquimal. Elas influenciam diretamente nas células T, inibindo a proliferação de células T ativadas e induzindo a proliferação das células T regulatórias (Wang e Zhao, 2009). As células mesenquimais possuem alta expressão de galectina-1 e provavelmente o efeito imunossupressor destas células é mediado por galectina-1 (Lepelletier *et al.*, 2009; Kadri *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, nós verificamos uma diminuição ou total ausência da expressão de GAL-1 em pacientes que apresentaram DECHa, quando comparados com o perfil protéico de doadores saudáveis. Uma vez que verificamos também que INF- $\gamma$  encontra-se aumentado em pacientes com DECHa, e que IL-10 encontra-se diminuído nestes pacientes, podemos sugerir que GAL-1 está participando ativamente no estabelecimento da doença. Ainda mais, podemos extrapolar para a participação de células T regulatórias no aparecimento da doença.

Outra proteína diferencialmente expressa em nossas análises é a proteína DJ-1, ou PARK7. Esta proteína é expressa em diversos tecidos, e essa expressão pode ser induzida por estímulo de fatores de crescimento. Ela está intimamente relacionada com o aparecimento do mal de Parkinson e recentemente foi associada ao aparecimento de tumores pulmonares, câncer de próstata e leucemias (Takahashi *et al.*, 2001).

A PARK7 interage com diversas outras PARKs e com a proteína MIZ-1 (Takahashi *et al.*, 2001). MIZ-1 é um fator de transcrição que suprime seletivamente a ativação de JNK1, induzida por TNF- $\alpha$  (Liu *et al.*, 2009). A JNK1, um membro da família MAPK, tem um papel importante na regulação da atividade de TNF- $\alpha$ , tais como inflamação, morte celular e tumorigenese (Liu *et al.*, 2009). Uma vez que ocorra a interação de MIZ-1 e PARK7, a atividade de TNF- $\alpha$  é diminuída.

Em nossas análises nós observamos que a proteína PARK7 encontra-se muito diminuída em pacientes que apresentavam DECHa. Portanto, é de se esperar que a atividade de TNF- $\alpha$  nestes pacientes esteja aumentada. Apesar de não termos encontrado diferenças estatisticamente significativas para TNF- $\alpha$  e o aparecimento da doença, outros grupos vem demonstrando que um dos principais mediadores da DECHa é a citocina TNF- $\alpha$  (Xun *et al.*, 1994; Ferrara, 1993).

Já a calreticulina é uma proteína diretamente envolvida na regulação dos canais de cálcio do retículo endoplasmático (Clark *et al.*, 2002). A calreticulina é uma proteína chaperona ligadora de Ca<sup>2+</sup> localizada predominantemente no retículo endoplasmático. A calreticulina regula a ativação de células T periféricas (Porcellini *et al.*, 2006). Em nossos pacientes a calreticulina estava aumentada em relação a doadores saudáveis. Este aumento provavelmente ocorre devido ao aumento da ativação de células T, mediadoras da DECHa conforme descrito na literatura.

Nosso ultimo alvo de estudo neste trabalho foi a proteína 14-3-3 $\zeta$ . Esta proteína interage com o receptor de IL-9, o mesmo receptor de IL-8. Em nossos estudos, nós vimos que esta proteína está diminuída em pacientes com DECHa, assim como vimos que pacientes com DECHa tem IL-8 aumentado, porém sem significância estatística. Mais estudos proteômicos devem ser realizados para confirmar a participação desta e das outras proteínas na DECHa.

Assim, vimos que existem moléculas inflamatórias e não inflamatórias, populações celulares e variáveis clínicas que podem influenciar diretamente no aparecimento da DECHa. Além disso, alguns desses parâmetros podem ser utilizados para prever o aparecimento da DECHa. Uma vez estabelecido estes parâmetros, podemos montar um score que prediga se determinado paciente irá desenvolver a doença ou não. Pacientes que possuam doença de base avançada, idade maior que 18 anos e recebendo SPM já possuem um maior risco de desenvolver DECHa. Se possuírem IFN- $\gamma$  e IL-5 aumentados, o risco de desenvolver DECHa aumenta. Com o

aumento das quimiocinas IP-10 e IL-8 ocorre um maior risco de desenvolver DECHa de TGI. Acompanhando as populações celulares, uma diminuição de linfócitos B e aumento de células NK entre os dias 14 e 45 predizem o risco de desenvolver a doença. Com essas informações, pretendemos traçar uma ficha de avaliação que nos forneça um score para prever o risco de determinado paciente desenvolver ou não a DECHa.



## *CONCLUSÕES*

- As variáveis match de HLA, idade do paciente e relação do doador interferem no risco do paciente desenvolver DECHa. Já as variáveis fonte de células e doença de base interferem no risco do paciente desenvolver a DECHa de pele e a variável idade do paciente aumenta o risco de desenvolver DECHa de TGI.

- A elevação dos níveis séricos das citocinas INF- $\gamma$  e IL-5 no D+14 acima de 12,74 e 4,70 pg/ml respectivamente aumenta o risco de desenvolver DECHa.

- A elevação dos níveis séricos no D+14 das quimiocinas IP-10 e IL-8 acima de 150 e 26 pg/ml respectivamente aumentam o risco de desenvolver DECHa de TGI.

- Em biópsias de pele não é possível utilizar as citocinas e quimiocinas estudadas como biomarcadoras da DECHa.

- Existe uma relação entre células NK e células B no risco de desenvolver DECHa. Pacientes tem um risco aumentado para DECHa quando tem elevada percentagem de células B logo após o TCTH e, a medida que a percentagem de células NK aumentam, sofrem decréscimo de linfócitos B.

- Existem proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com DECHa e doadores saudáveis. Destas, nós sugerimos que as proteínas galectina-1, calreticulina, DJ-1 e 14-3-3 $\zeta$  tenham participação no desenvolvimento da doença.

*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

- Ahya R, Douglas JG, Watson HG. (1998). Transfusion associated graft versus host disease in an immunocompetent individual following coronary artery bypass grafting. *Heart*, 80(3):299-300.
- Akpek G, Boitnott JK, Lee LA, Hallick JP, Torbenson M, Jacobsohn DA, Arai S, Anders V, Vogelsang GB. (2002). Hepatic variant of graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusion. *Blood.*, 100:3903–3907.
- Anasetti C, Rybka W, Sullivan KM, Banaji M, Slichter SJ. (1989) Graft-vs-host disease is associated with autoimmune-like thrombocytopenia. *Blood*; 73: 1054–58.
- Antin JH, Ferrara JL. (1992). Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*;80:2964–8.
- Arai S, Lee LA, Vogelsang GB. (2002). A systematic approach to hepatic complications in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res.*,11:215–229.
- Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB. (1996). The role of cell mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med.*, 183:2645–56.
- Barker JN, Wagner JE. (2003) Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*; 3: 526–532.
- Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. (1956). Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. *BMJ*, 2:626–27.
- Baum, L. G., D. P. Blackall, S. Arias-Magallano, D. Nanigian, S. Y. Uh, J. M. Browne, D. Hoffmann, C. E. Emmanouilides, M. C. Territo, and G. C. Baldwin. (2003). Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 109: 295–307.
- Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R *et al.* (1985). Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med.*, 313:765–771.
- Beck, S., and Trowsdale, J. (1999). Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol. Rev.* 167, 201–210.
- Billingham RE, Brent L, Brown JB, Medawar PB. (1959). Time of onset and duration of transplantation immunity. *Transplant Bull*, 6:410–4.
- Billingham RE. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 62:21–

- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*.;279:381-384.
- Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*. 400:776-780.
- Carpenter PA, Pavlovic S, Tso JY, Press OW, Gooley T, Yu XZ, Anasetti C. (2000). Non-Fc receptor binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. *J Immunol*. 165:6205–6213.
- Chang RJ, Lee SH. (1986). Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol*, 137:2853–6.
- Clark RA, Li SL, Pearson DW, Leidal KG, Clark JR, Denning GM, Reddick R, Krause KH, Valente AJ. (2002). Regulation of calreticulin expression during induction of differentiation in human myeloid cells. Evidence for remodeling of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 277(35):32369-78
- Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K.(2004). Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management *Cancer*. 101(9):1936-46.
- Culina S, Lauvau G, Gubler B, van Endert P. (2004) Calreticulin Promotes Folding of Functional Human Leukocyte Antigen Class I Molecules *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (52) 54210–54215.
- Dai WJ, Waldvogel A, Siles-Lucas M, Gottstein B. (2004). *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an alpha beta CD4 T-cell-mediated immune response. *Immunology*. 112(3):481-8
- Daneshpouy M, Socie G, Lemann M, Rivet J, Gluckman E, Janin A. (2002). Activated eosinophils in upper gastrointestinal tract of patients with graft-versus-host disease. *Blood*. 99(8):3033-40.

- de Waal Malefyt R., Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, and de Vries JE. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174: 915–924.
- Deeg HJ, Lin D, Leisenring W, Boeckh M, Anasetti C, Appelbaum FR, Chauncey TR, Doney K, Flowers M, Martin P, Nash R, Schoch G, Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R. (1997). Cyclosporine or cyclosporine plus methylprednisolone for prophylaxis of graft-versus-host disease: a prospective, randomized trial. *Blood*, 89: 3880-3887
- Deeg HJ (2007). How I treat refractory acute GVHD. *Blood*, 109(10);4119-4126.
- Dennert, G., Anderson, C.G., and Warner, J. (1985). T killer cells play a role in allogeneic bone marrow graft rejection but not in hybrid resistance. *J. Immunol.* 135, 3729–3734.
- Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet.* 353:1083–91.
- Dickinson AM, Sviland L, Dunn J, Carey P, Proctor SJ. (1991). Demonstration of direct involvement of cytokines in graft-versus-host reactions using an in vitro human skin explant model. *Bone Marrow Transplant.* 7:209–16.
- Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, Ordemann R, Clouthier SG, Lowler K, Liu C, Gerard C, Cooke KR, Ferrara JL. (2003). Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol.* 31:897–902.
- Fändrich F, Zepernick-Kalinski C, Lin X. (1998). GvHD after small bowel transplantation: the role of caspases, FAS-L, and galectin-1. *Transplant Proc.* 30(6):2594-5
- Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. (2003). The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 78:181–7.
- Ferrara JL, Deeg HJ. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 324:667–74.
- Ferrara JL. (1993). Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol.* 5:794–9.

- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. (2005). 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(12):945-56
- Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D. (2004) 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 transplantation outcome. *Blood.* 104: 1923–1930.
- Foss FM, DiVenuti GM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, Chan G, Stiffler K, Miller KB. (2005). Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroidrefractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant.* 35:1187-1193.
- Fujii N, Hiraki A, Aoe K, Murakami T, Ikeda K, Masuda K, Matsuo K, Shinagawa K, Ishimaru F, Sugi K, Darzynkiewicz Z, Tanimoto M. (2006) 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. *Inter J Mol Medicine* 17: 881-885,
- Gajewski J, Champlin R. (1996). Bone marrow transplantation from unrelated donors. *Curr Opin Oncol.* 8:84–88.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. (2001). Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol.* 29:259–277.
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. (1996). Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients

- and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 334:281–85.
- Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. (1997). Perforin/granzymedependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 100:904–11.
- Greinix HT, Volc-Platzer B, Kalhs P, Fischer G, Rosenmayr A, Keil F, Hönigsmann H, Knobler RM. (2000). Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood.* 96:2426-2431.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature.* 343:336–40.
- Hansen, JA, Petersdorf, EW, Martin, PJ, and Anasetti, C. (1997). Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. *Immunol. Rev.* 157, 141–151.
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 1(6):475-482.
- Hattori K, Hirano T, Miyajima H, Yamakawa N, Tateno M, Oshimi K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. (1998) Differential effects of anti- Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood.* 91:4051–5.
- Hayashi T, Ishimori C, Takahashi-Niki K, Taira T, Kim YC, Maita H, Maita C, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. (2009). DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 390(3):667-72
- Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. (1997). Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood.* 90:3204–13.
- Hings IM, Filipovich AH, Miller WJ, Blazar BL, McGlave PB, Ramsay NK, Kersey JH, Weisdorf DJ. (1993). Prednisone therapy for acute graft-versus-host disease: short- versus longterm treatment. A prospective randomized trial. *Transplantation.* 56:577–580.



- Ho IC, Glimcher LH. (2002). Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell*. 109 (suppl.):S109–20.
- Ho VT, Zahrieh D, Hochberg E, Micale E, Levin J, Reynolds C, Steckel S, Cutler C, Fisher DC, Lee SJ, Alyea EP, Ritz J, Soiffer RJ, Antin JH. (2004). Safety and efficacy of denileukin diftitox in patients with steroid refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 104:1224–1226.
- Ho VT, Soiffer RJ. (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 98(12): 3192-3204
- Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Imai K, Tsutsumi H, Kokai Y. (2008) CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. *Blood*. 15;111(8):4403-12.
- Imamura M, Hashino S, Kobayashi H, Kubayashi S, Hirano S, Minagawa T, Tanaka J, Fujii Y, Kobayashi M, Kasai M, *et al.* (1994). 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 Transplant*. 13(6):745-51.
- Imoto S, Oomoto Y, Murata K, Das H, Murayama T, Kajimoto K, Sugimoto T, Gomyo H, Nakagawa T, Nishimura R, Koizumi T. (2000). Kinetics of serum cytokines after allogeneic bone marrow transplantation: interleukin-5 as a potential marker of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol.*, 72(1):92-7.
- Iqbal N, Salzman D, Lazenby AJ, Wilcox CM. (2000). Diagnosis of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Gastroenterol*. 95:3034–3038.
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB. (2007) Acute graft versus host disease. *Orph J Rare Dis*. 2:35
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB. (2002). Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD. *Drugs*. 62:879–889.
- Jacobsohn DA. (2008) Acute graft-versus-host disease in children. *Bone Marrow Transplant* 41:215–221.
- Jaksch M, Remberger M, Mattsson J. (2005) Increased Gene Expression of Chemokine Receptors Is Correlated with Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11:280-287

- Johnson-Leger C, Imhof BA. (2003) Forging the endothelium during inflammation: pushing at a halfopen door? *Cell Tissue Res.* 314:93-105.
- Johnston L. (2008) Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft sources and conditioning intensity. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 21(2):177–192.
- Jourdan E, Boiron JM, Dastugue N, Vey N, Marit G, Rigal-Huguet F, Molina L, Fegueux N, Pigneux A, Recher C, Rossi JF, Attal M, Sotto JJ, Maraninchi D, Reiffers J, Bardou VJ, Esterni B, Blaise D. (2005) Early allogeneic stem-cell transplantation for young adults with acute myeloblastic leukemia in first complete remission: an intent-to-treat long-term analysis of the BGMT experience. *J Clin Oncol.* 23: 7676–7684.
- Junghans RP, Waldmann TA, Landolfi NF, Avdalovic NM, Schneider WP, Queen C. (1990). Anti-Tac-H, a humanized antibody to the interleukin 2 receptor with new features for immunotherapy in malignant and immune disorders. *Cancer Res.*;50:1495–1502.
- Kadri T, Lataillade JJ, Doucet C, Marie A, Ernou I, Bourin P, Joubert-Caron R, Caron M, Lutomski D. (2005). Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14(2):204-12
- Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E, Ganser A, Hertenstein B, Mischak H, Weissinger EM. (2004) Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood,* 104(2):340-9.
- Klimpel GR, Annable CR, Cleveland MG, Jerrells TR, Patterson JC. (1990) Immunosuppression and lymphoid hypoplasia associated with chronic graft versus host disease is dependent upon IFN-gamma production. *J Immunol;*144:84–93.
- Kumar P, Defor TE, Brunstein C, Barker JN, Wagner JE, Weisdorf DJ, Burns LJ. (2008) Burns Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Adult Acute Lymphocytic Leukemia: Impact of Donor Source on Survival. *Biol Blood Marrow Transplant;* 14:1394-1400.
- Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW. (2000) Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: epithelial expression of

- tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med.* 192:761-768.
- Kuykendall TD, Smoller BR. (2003). Lack of specificity in skin biopsy specimens to assess for acute graft-versus-host disease in initial 3 weeks after bone-marrow transplantation. *J Am Acad Dermatol.*, 49:1081–1085.
- Lee EY, Lee ZH, Song YW. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases *Autoimmunity Reviews* 8 379–383
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj J.*;19(7-9):433-40
- Lepelletier Y, Lecourt S, Arnulf B, Vanneaux V, Femand JP, Menasche P, Domet T, Marolleau JP, Hermine O, Larghero J (2009). Galectin-1 and Semaphorin-3A are two soluble factors conferring T cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev.*2009 Nov 3. [Epub ahead of print]
- Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. (2003). Clinical proteomics: written in blood. *Nature.* Oct 30;425(6961):905.
- Liu H, Wang M, Li M, Wang D, Rao Q, Wang Y, Xu Z, Wang J. (2008). Expression and role of DJ-1 in leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 375(3):477-83.
- Locatelli F, Bruno B, Zecca M, Van-Lint MT, McCann S, Arcese W, Dallorso S, Di Bartolomeo P, Fagioli F, Locasciulli A, Lawler M, Bacigalupo A. (2000). Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial. *Blood*; 96: 1690-1697.
- Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M, Perrier P, Masson D, Moine A, Absi L, Reviron D, Lepage V, Tamouza R, Toubert A, Marry E, Chir Z, Jouet JP, Blaise D, Charron D, Raffoux C. (2007). 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. *Biol Blood Marrow Transplant*; 13: 965–974.
- Loughran TP Jr, Deeg HJ, Dahlberg S, Kennedy MS, Storb R, Thomas ED. (1985). Incidence of hypertension after marrow transplantation among 112 patients

- randomized to either cyclosporine or methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis. *British Journal of Haematology*; 59: 547-553.
- Luker KE, Smith MCP, Luker GD, Gammon ST, Piwnica-Worms H, Piwnica-Worms D. (2004). Kinetics of regulated protein–protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *PNAS*, 101(33) 12288–12293.
- Marsh, S.G.E. (2000). Nomenclature for factors of the HLA system: update March 2000. *Tissue Antigens* 56, 103–104.
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE, *et al.* (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*, 76:1464–1472.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*;296:301–5.
- Moore KW, O’Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, and Mosmann TR. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 165–190.
- Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. (2009). Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol*, 157: 325–331
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25(2):75-84.
- Mowat AM. (1989). Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. *Immunology* 68:18–23.
- Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K. (1999). Active participation of CCR5(–)CD8(–) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 104:49 –57.
- Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R, Ratanatharathorn V. (2000). Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 96: 2062-2068.

- New JY, Li B, Koh WP, Ng HK, Tan SY, Yap EH, Chan SH, Hu HZ. (2002). T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 29:979–86.
- Obsilová V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. (2008). 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res. Suppl* 3:S11-21.
- Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R, Misek DE, Cooke KR, Kitko CL, Weyand A, Bickley D, Jones D, Whitfield J, Reddy P, Levine JE, Hanash SM, Ferrara JL. (2009). A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*. 113(2):273-8.
- Paczesny S, Levine JE, Braun TM, Ferrara JL. (2009). Plasma biomarkers in graft-versus-host disease: a new era? *Biol Blood Marrow Transplant*. (1 Suppl):33-8
- Papadakis KA, Landers C, Prehn J, Kouroumalis EA, Moreno ST, Gutierrez-Ramos JC, Hodge MR, Targan SR. (2003). CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J Immunol*. 171:159-165.
- Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736–739.
- Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA. (1995). The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 86: 1606–13.
- Piper KP, Horlock C, Curnow SJ, Arrazi J, Nicholls S, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. (2007). CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 110:12:3827-32.
- Pizzatti L, Sá LA, de Souza JM, Bisch PM, Abdelhay E. (2006). Altered protein profile in chronic myeloid leukemia chronic phase identified by a comparative proteomic study. *Biochim Biophys Acta*. 1764(5):929-42.
- Platanias LC, Fish EN. (1999). Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol*. 27(11):1583-92.
- Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. (1996). Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 61:343–9.

- Porcellini S, Traggiai E, Schenk U, Ferrera D, Matteoli M, Lanzavecchia A, Michalak M, Grassi F (2006). Regulation of peripheral T cell activation by calreticulin. *J Exp Med.* 203 (2) 461–471
- Przepiorka D, Khouri I, Ippoliti C, Ueno NT, Mehra R, Körbling M, Giralt S, Gajewski J, Fischer H, Donato M, Cleary K, Claxton D, Chan KW, Braunschweig I, van Besien K, Andersson BS, Anderlini P, Champlin R. (1999). Tacrolimus and minidose methotrexate for prevention of acute graft-versus-host disease after HLA-mismatched marrow or blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 24:763–768.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. (1995). Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant,* 15:825–828.
- Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA. (1989). A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:10029–10033.
- Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. (1998). Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 92: 2303–14.
- Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K, Ferrara JL. (2001). Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J Exp Med* 194:1433–40.
- Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. (2002). Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196:999–1005.
- Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. (2001). CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.

- Remberger M, Jaksch M, Uzunel M, Mattsson J. (2003). Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 70: 384–391
- Rhodes DR, Tomlins SA, Varambally S, Mahavisno V, Barrette T, Kalyana-Sundaram S, Ghosh D, Pandey A, Chinnaiyan AM. (2005). Probabilistic model of the human protein-protein interaction network. *Nat Biotechnol.* 23(8):951-9
- Ringden O. (1986). Cyclosporine in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 42:445–52.
- Roy J, McGlave PB, Filipovich AH, Miller WJ, Blazar BR, Ramsay NK, Kersey JH, Weisdorf DJ. (1992). Acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation: failure of conventional therapy. *Bone Marrow Transplant* 10:77–82.
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437(7062):1173-8.
- Ruutu T, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. (1997). A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow, Transplantation (EBMT). Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 19:759–764.
- Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. (2007). Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 37 (Suppl. 1):S116–23.
- Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH. (2001). Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest* 108:943–8.
- Salomon BL, Sudres M, Cohen JL. (2006). Regulatory T cells in graft-versus-host disease. *Springer Semin Immun* 28 25-29
- Santucci, L., S. Fiorucci, N. Rubinstein, A. Mencarelli, B. Palazzetti, B. Federici, G. A. Rabinovich, and A. Morelli. (2003). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124: 1381–1394.

- Santucci, L., S. Fiorucci, F. Cammilleri, G. Servillo, B. Federici, and A. Morelli. (2000). Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31: 399–406.
- Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J. (1995). Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* 7:251–259.
- Serody JS, Burkett SE, Panoskaltsis-Mortari A, Ng-Cashin J, McMahon E, Matsushima GK, Lira SA, Cook DN, Blazar BR. (2000). T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1alpha is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood* 96:2973–80.
- Shiina TG, Takishima N, Inoko H. (1999). Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb human MHC class I region. *Immuno. Rev* 167, 193–199.
- Shlomchik WD. (2007). Graft-versus-host disease *Nature Reviews Immunol*; 7: 340-352.
- Socie G, Mary JY, Lemann M, Daneshpouy M, Guardiola P, Meignin V, Ades L, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Gluckman E, Ameisen JC, Janin A. (2004). Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood* 103:50–57.
- Sorrer ML, Leisenring W, Deeg HJ, Martin PJ, Storb R. (2005). Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 814-815.
- Springer TA. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
- Srinivasan R, Daniels J, Fusaro V, Lundqvist A, Killian JK, Geho D, Quezado M, Kleiner D, Rucker S, Espina V, Whiteley G, Liotta L, Petricoin E, Pittaluga S, Hitt B, Barrett AJ, Rosenblatt K, Childs RW. (2006). Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis. *Exp Hematol* 34 (6):796-801.



- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksöz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*. 122(6):957-68
- Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. (2008). Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol*. 180(5):3091-102
- Storb R, Deeg HJ, Fisher L, Appelbaum F, Buckner CD, Bensinger W, Clift R, Doney K, Irle C, McGuffin R, *et al.* (1988). Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials. *Blood* 71: 293-298.
- Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. (2001). DJ-1 Positively Regulates the Androgen Receptor by Impairing the Binding of PIAS<sub>x</sub> to the Receptor. *J Biol Chem* 276; 40:37556–37563,
- Tamai R, Sakuta T, Matsushita K, Torii M, Takeuchi O, Akira S, Akashi S, Espevik T, Sugawara S, Takada H. (2002) Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infect Immun*, 70(3):1272-8.
- Taylor AL, Gibbs P, Bradley JA. (2004). Acute graft versus host disease following liver transplantation: the enemy within. *Am J Transplant*. 4(4):466-74
- Teshima T, Ferrara JL. (2002). Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol* 39(1):15-22
- Toniolo P, Taioli E. (1995). Development of biomarkers of human exposure to carcinogens: the example of DNA-protein cross-links. *Toxicol Lett* 77(1-3):231-4.
- Tseng SY, Dustin ML. (2002). T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 14:575–80.
- Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 54:29 – 52.

- Vogelsang GB. (2000). Advances in the treatment of graft-versus-host disease. *Leukemia* 14:509–510.
- von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, Butler MO, Xia Z, Zeng WY, Wucherpfennig KW, Nadler LM, Schultze JL. (2002). Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 99(9):3319-3325.
- Wall DA, Sheehan KC. (1994). The role of tumor necrosis factor and interferon gamma in graft-versus-host disease and related immunodeficiency. *Transplantation* 57:273–9.
- Wandroo F, Auguston B, Cook M, Craddock C, Mahendra P. (2004). Successful use of Campath-1H in the treatment of steroid refractory liver GvHD. *Bone Marrow Transplant* 34:285-287.
- Wang L, Zhao RCH (2009). Mesenchymal stem cells targeting the GVHD. *Sci China Ser C-Life Sci*, 52(7): 603-609,
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148:1274–9.
- Weinstein A, Dexter D, KuKuruga DL, Philosophe B, Hess J, Klassen D.(2006). Acute graft-versus-host disease in pancreas transplantation: a comparison of two case presentations and a review of the literature. *Transplantation*. 82(1):127-31
- Weissinger EM, Schiffer E, Hertenstein B, Ferrara JL, Holler E, Stadler M, Kolb HJ, Zander A, Züribig P, Kellmann M, Ganser A. (2007). Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 109:12.
- Wysocki CA, Burkett SB, Panoskaltis-Mortari A, Kirby SL, Luster AD, McKinnon K, Blazar BR, Serody JS. (2004). Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J Immunol* 173:845–54.
- Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS (2005). Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 105(11):4191-9
- Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. (1994). 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* 83:2360–7.

Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, Pearson DA, Sykes M. (1998). Donorderived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest* 102:2126–35.

*ANEXOS*

## **Anexo 1**

### **Tabela dos dados clínicos e biológicos dos pacientes participantes deste projeto**

**Tabela A1 – Dados clínicos dos pacientes deste estudo**

Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
1	Masc	45	LMA	Hemopatias malignas avançadas	23-dez-2005	SP	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA	Sim	45	Sim	Não	Não	2	Sim	67	Infecção
2	Fem	47	LNH	Linfomas e Mielomas	18-jan-2006	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA	Não	-	-	-	-	-	Sim	33	Infecção
3	Masc	33	LMA	Hemopatias malignas precoces	24-jan-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA	Não	-	-	-	-	-	Sim	13	Infecção
4	Masc	29	AAS	Hemopatias benignas	15-fev-2006	MO	Sim	Completo	Cy	Mieloablativo	CSA	Sim	28	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
5	Masc	39	LLA	Hemopatias malignas precoces	15-mar-2006	SP	Sim	Completo	CyTBI	Mieloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	23	Infecção
6	Fem	35	LMA	Hemopatias malignas precoces	29-mar-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA+MTX	Sim	57	Sim	Não	Sim	3	Sim	558	DECH
7	Fem	31	LNH	Linfomas e Mielomas	11-abr-2006	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	36	Toxicidade
8	Masc	23	LMC	Hemopatias malignas precoces	19-abr-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
9	Fem	35	LMA	Hemopatias malignas avançadas	25-abr-2006	MO	Não	Completo	ATG/CyTBI	Mieloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	20	Toxicidade
10	Masc	17	LMA	Hemopatias malignas avançadas	21-jun-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	87	Recaída
11	Masc	10	LMA	Hemopatias malignas avançadas	29-jun-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
12	Masc	6	LLA	Hemopatias malignas avançadas	29-jun-2006	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mieloablativo	CSA	Sim	28	Sim	Não	Não	1	Sim	276	Recaída
13	Masc	53	MM	Linfomas e Mielomas	01-ago-2006	SP	Sim	Completo	FluMel	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	84	Sim	Não	Sim	2	Sim	320	Recaída
14	Fem	10	LMA	Hemopatias malignas avançadas	16-ago-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mieloablativo	CSA+MTX	Sim	63	Sim	Não	Não	2	Sim	145	DECH
15	Masc	10	LNH	Linfomas e Mielomas	23-ago-2006	MO	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
16	Fem	10	AF	Hemopatias benignas	13-set-2006	MO	Sim	Completo	Cy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
17	Masc	28	AAS	Hemopatias benignas	19-set-2006	MO	Sim	Completo	ATG/Cy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	100	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
18	Fem	25	LH	Linfomas e Mielomas	03-out-2006	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	468	Recaída

Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
19	Fem	12	AAS	Hemopatias benignas	11-out-2006	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
20	Fem	14	SMD	Hemopatias malignas precoces	18-out-2006	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
21	Masc	38	LMA	Hemopatias malignas avançadas	18-out-2006	MO	Sim	Completo	MelTBI	Mioloablativo	CSA	Sim	105	Sim	Não	Sim	2	Sim	261	DECH
22	Masc	28	LNH	Linfomas e Mielomas	29-nov-2007	SP	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Não	Não	Sim	3	Não	-	-
23	Fem	10	AF	Hemopatias benignas	09-jan-2007	MO	Sim	Completo	Cy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	16	Sim	Sim	Sim	4	Sim	36	DECH
24	Fem	15	LLA	Hemopatias malignas precoces	17-jan-2007	SP	Não	Completo	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	81	Infecção
25	Masc	22	AAS	Hemopatias benignas	17-jan-2007	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	150	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
26	Masc	24	LMA	Hemopatias malignas avançadas	12-fev-2007	SP	Sim	Completo	MelTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	120	Recaída
27	Masc	9	LLA	Hemopatias malignas avançadas	28-fev-2007	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
28	Masc	31	LH	Linfomas e Mielomas	02-mar-2007	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	48	Não	Sim	Sim	3	Sim	64	Infecção
29	Fem	28	LMA	Hemopatias malignas precoces	09-mar-2007	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
30	Masc	25	LNH	Hemopatias malignas avançadas	28-mar-2007	MO	Sim	Completo	CyTBI	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
31	Masc	52	LMC	Hemopatias malignas avançadas	04-abr-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	100	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
32	Masc	31	SMD	Hemopatias malignas avançadas	04-abr-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	26	Sim	Não	Sim	2	Não	-	-
33	Fem	16	LB	Hemopatias malignas precoces	04-abr-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
34	Masc	10	LMC	Hemopatias malignas precoces	24-mai-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
35	Masc	51	MM	Linfomas e Mielomas	04-jun-2007	SP	Sim	Completo	FluMel	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
36	Masc	24	HPN	Hemopatias benignas	11-jul-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	180	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
37	Masc	9	AAS	Hemopatias benignas	25-jul-2007	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	40	Toxicidade
38	Masc	60	LNH	Linfomas e Mielomas	15-ago-2007	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	150	Sim	Não	Não	2	Não	-	-

Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
39	Fem	49	LLA	Hemopatias malignas precoces	11-set-2007	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	26	Sim	Não	Sim	2	Sim	41	Toxicidade
40	Masc	47	LLA	Hemopatias malignas avançadas	18-set-2007	MO	Sim	Completo	BuMel	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Sim	Sim	Sim	4	Sim	104	Infecção
41	Fem	20	AAS	Hemopatias benignas	31-out-2007	MO	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	25	Infecção
42	Masc	20	LNH	Linfomas e Mielomas	05-nov-2007	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	56	Sim	Sim	Sim	3	Sim	77	Recaída
43	Fem	45	SMD	Hemopatias malignas precoces	07-nov-2007	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	23	Sim	Não	Não	2	Sim	155	Infecção
44	Fem	31	LLA	Hemopatias malignas avançadas	28-nov-2007	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Sim	Não	Sim	2	Sim	63	Toxicidade
45	Fem	14	LLA	Hemopatias malignas avançadas	03-jan-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	35	Sim	Não	Não	2	Sim	59	Recaída
46	Masc	20	LMA	Hemopatias malignas avançadas	14-jan-2008	SCUP	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MMF	Não	-	-	-	-	-	Sim	27	Infecção
47	Masc	12	LLA	Hemopatias malignas avançadas	17-jan-2008	SCUP	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MMF	Sim	26	Sim	Não	Sim	3	Não	-	-
48	Fem	7	AAS	Hemopatias benignas	18-jan-2008	SCUP	Não	Completo	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA	Sim	22	Sim	Não	Não	3	Não	-	-
49	Fem	31	LMA	Hemopatias malignas precoces	23-jan-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	16	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
50	Masc	36	LMA	Hemopatias malignas precoces	24-jan-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	18	Não	Não	Sim	2	Não	-	-
51	Masc	22	LMC	Hemopatias malignas avançadas	21-fev-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	13	Sim	Não	Sim	2	Não	-	-
52	Fem	24	LH	Linfomas e Mielomas	22-fev-2008	SP	Sim	Completo	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	29	Não	Não	Sim	3	Não	-	-
53	Masc	5	LLA	Hemopatias malignas precoces	27-fev-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
54	Masc	37	AAS/SMD	Hemopatias benignas	05-mar-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	28	Sim	Sim	Sim	4	Sim	39	Infecção
55	Masc	8	LLA	Hemopatias malignas avançadas	06-mar-2008	SCUP	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
56	Masc	13	LLA	Hemopatias malignas precoces	12-mar-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-



Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
57	Masc	39	LMC	Hemopatias malignas avançadas	19-mar-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	14	Não	Não	Sim	2	Não	-	-
58	Masc	5	LLA	Hemopatias malignas avançadas	20-mar-2008	SCUP	Não	Incompleto	CyTBI	Mioloablativo	MTX+FK	Não	-	-	-	-	-	Sim	37	Toxicidade
59	Masc	26	LLA	Hemopatias malignas avançadas	16-abr-2008	MO	Não	Completo	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	22	Sim	Sim	Sim	4	Sim	47	DECH
60	Masc	15	AAS	Hemopatias benignas	15-abr-2008	SP	Sim	Completo	CyTBI	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	50	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
61	Fem	52	LLA	Hemopatias malignas avançadas	24-abr-2008	SP	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	48	Sim	Não	Sim	3	Sim	213	Infeção
62	Fem	31	SMD	Hemopatias malignas precoces	08-mai-2008	MO	Não	Completo	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
63	Fem	29	SMD	Hemopatias malignas precoces	16-mai-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	59	Não	Não	Sim	2	Não	-	-
64	Masc	8	LLA	Hemopatias malignas avançadas	28-mai-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
65	Fem	20	LH	Linfomas e Mielomas	04-jun-2008	MO	Não	Incompleto	ATGCy FluTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	23	Infeção
66	Fem	13	LMMJ	Hemopatias malignas precoces	12-jun-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	33	Sim	Não	Não	1	Não	-	-
67	Masc	12	LLA	Hemopatias malignas avançadas	18-jun-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
68	Masc	44	LMC	Hemopatias malignas avançadas	19-jun-2008	MO	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	36	Sim	Sim	Não	3	Sim	74	Desconhecida
69	Masc	11	LLA	Hemopatias malignas avançadas	03-jul-2008	SCUP	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
70	Fem	21	HPN	Hemopatias benignas	09-jul-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	14	Não	Sim	Sim	3	Sim	83	DECH
71	Masc	23	LLA	Hemopatias malignas precoces	10-jul-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
72	Masc	46	LLA	Hemopatias malignas precoces	23-jul-2008	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	41	Sim	Não	Não	3	Não	-	-
73	Fem	25	HPN	Hemopatias benignas	24-jul-2008	MO	Não	Completo	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	47	Toxicidade
74	Masc	37	LNH	Linfomas e Mielomas	28-jul-2008	SP	Sim	Incompleto	CyFlu	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
75	Masc	36	LMC	Hemopatias malignas precoces	30-jul-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	45	Sim	Não	Sim	4	Sim	123	Recaída

Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
76	Masc	53	LMC	Hemopatias malignas precoces	30-jul-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
77	Masc	46	LMA	Hemopatias malignas avançadas	01-ago-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	40	Sim	Não	Sim	3	Sim	73	Infecção
78	Fem	49	LMC	Hemopatias malignas precoces	24-set-2008	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
79	Masc	5	LLA	Hemopatias malignas avançadas	25-set-2008	SCUP	Sim	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MMF	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
80	Masc	36	AAS	Hemopatias benignas	01-out-2008	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	15	Infecção
81	Masc	45	LH	Linfomas e Mielomas	06-out-2008	SP	Sim	Completo	CyTBI	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	150	Não	Sim	Não	2	Não	-	-
82	Masc	21	LH	Linfomas e Mielomas	22-out-2008	SP	Sim	Completo	CyTBI	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	100	Sim	Sim	Não	2	Não	-	-
83	Masc	41	LMA	Hemopatias malignas avançadas	23-out-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	59	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
84	Masc	55	LMMC	Hemopatias malignas avançadas	26-nov-2008	SP	Sim	Completo	FluMel	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
85	Masc	29	LMC	Hemopatias malignas precoces	03-dez-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	37	Sim	Sim	Não	2	Não	-	-
86	Masc	17	LMA	Hemopatias malignas avançadas	05-dez-2008	MO	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
87	Masc	47	LMA	Hemopatias malignas precoces	17-dez-2008	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	40	Sim	Não	Não	1	Não	-	-
88	Fem	36	LH	Linfomas e Mielomas	18-dez-2008	SCUP	Não	Incompleto	ATGCy TBI	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
89	Masc	12	AAS	Hemopatias benignas	07-jan-2009	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	CAS+MTX	Sim	50	Sim	Não	Não	1	Não	-	-
90	Masc	23	LH	Linfomas e Mielomas	16-jan-2009	SP	Sim	Completo	CyTBI	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	24	Sim	Sim	Não	2	Não	-	-
91	Masc	32	LMA	Hemopatias malignas avançadas	27-jan-2009	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	17	Não	Não	Sim	4	Não	-	-
92	Masc	12	LMA	Hemopatias malignas avançadas	28-jan-2009	MO	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	34	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
93	Masc	19	SMD	Hemopatias malignas avançadas	05-fev-2009	MO	Sim	Completo	Flu	Mioloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
94	Fem	25	LH	Linfomas e Mielomas	09-fev-2009	SP	Sim	Completo	BuCy	Mioloablativo	CSA+MTX	Sim	24	Não	Não	Sim	4	Não	-	-
95	Masc	51	MM	Linfomas e Mielomas	09-fev-2009	SP	Sim	Completo	FluMel	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Sim	49	Infecção

Nº	SEXO	ID	DÇA DE BASE	CLASS DÇA	DATA TMO	FONTE CEL	PARENTE	HLA	CONDIC	TIPO COND	PROF DECH	DECH SN	DIA DECH	PELE	FIGADO	TGI	EST DECH	OBITO	DIA OBITO	CAUSA OBITO
96	Masc	22	LLA	Hemopatias malignas avançadas	18-fev-2009	MO	Sim	Completo	CyTBI	Mieloablativo	CSA+MTX	Sim	68	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
97	Masc	8	AAS	Hemopatias benignas	12-mar-2009	MO	Não	Completo	ATGBu CY	Intensidade reduzida	CSA+MTX	Sim	25	Sim	Não	Não	2	Não	-	-
98	Fem	5	LLA	Hemopatias malignas precoces	19-mar-2009	MO	Não	Completo	ATGCy TBI	Mieloablativo	CSA+MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
99	Fem	26	AAS	Hemopatias benignas	25-mar-2009	MO	Sim	Completo	ATGCy	Intensidade reduzida	MTX	Não	-	-	-	-	-	Não	-	-
100	Masc	26	SMD	Hemopatias malignas precoces	26-mar-2009	MO	Não	Completo	ATGCy TBI	Mieloablativo	CSA+MTX	Sim	23	Sim	Sim	Sim	2	Não	-	-

Legenda: ID – idade; DÇA DE BASE – doença de base; CLASS DÇA – classificação da doença; FONTE CEL – fonte de células; CONDIC – regime de condicionamento; TIPO CONDIC – tipo de condicionamento; PROF DECH – profilaxia da DECH; DECH SN – ocorrência de DECH (S – sim; N – não); DIA DECH – dia de ocorrência da DECHa; PELE, FIGADO, TGI – órgãos de ocorrência da DECHa; EST DECH – estadiamento da DECHa; Masc – masculino; FEM – feminino; AAS – anemia aplastica severa; LLA – leucemia linfoblástica aguda; LMA – leucemia mielocística aguda; LMC – leucemia mieloide crônica; LH – linfoma de Hodgkin; LNH – linfoma não Hodgkin; MM – mieloma múltiplo; HPN – hemoglobinúria paroxística noturna; SMD – síndrome mielodisplásica; LB – leucemia bifenotípica; LMMJ – leucemia mielomonocítica juvenil; LMMC – leucemia mielomonocítica crônica; AF – anemia de Fanconi; MO – medula óssea; SP – sangue periférico; SCUP – sangue de cordão umbilical e placentário; Cy – ciclofosfamida; TBI – do inglês *total body irradiation* – irradiação corpórea total; ATG – antitumoglobulina; Bu – bussulfan; Flu – fludarabina; Mel – melphalan; CSA – ciclosporina; MTX – metotrexate; MMF – micofenolato mofetil.

## **Anexo 2**

### **Carta de aprovação do CEP-INCA**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Instituto Nacional de Câncer  
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Dr. William Saad Hosne  
Coordenador do Grupo de Trabalho - CONEP-MS  
Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde  
Bloco G - Anexo - Ala B - 1º andar - Salas 128 a 147  
70058-901 - Brasília - DF

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2006

**Registro CEP nº 033/06** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)  
**Título do Projeto:** Moléculas envolvidas no endereçamento de células tronco humanas

Prezado Doutor

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, encaminha a V.S<sup>a</sup>, através de seu Presidente, os documentos que fazem parte do protocolo de pesquisa intitulado: Moléculas envolvidas no endereçamento de células tronco humanas, tendo como Pesquisador Principal nessa Instituição, a Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay, por ter sido este estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição em 07 de julho de 2006.

Relacionamos os documentos anexos:

- Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos
- Parecer consubstanciado do CEP-INCA

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

### **Anexo 3**

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de biópsias de pele**



## Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido ao Paciente

É necessário que o (a) senhor (a) leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, caso o(a) senhor(a) não entenda qualquer palavra ou informação, por favor peça explicações detalhadas para o profissional do serviço.

**Nome do estudo:** “AVALIAÇÃO PRECOCE DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO ATRAVÉS DE EXAME HISTOPATOLÓGICO DA PELE E IMUNOHISTOQUÍMICA SERIADAS.”

### **Objetivo do estudo:**

A doença enxerto contra hospedeiro é uma das complicações mais importantes que ocorre após o transplante de células tronco hematopoéticas (medula óssea). Pode se manifestar na pele com o aparecimento de manchas vermelhas em face, tronco e membros, assim como em outros órgãos como o fígado, a boca, o estômago, o intestino e os pulmões. Se utilizam medicações na prevenção desta complicação. O tratamento em geral é feito com medicações que diminuem a imunidade do paciente, aumentando o risco de infecções.

O objetivo principal deste estudo é verificar através de exames especializados (histopatologia e imunohistoquímica) a forma como aparece a doença. Para tal são necessárias biópsias seriadas de pele, além de coletas simultâneas de sangue, para identificar precocemente, antes mesmo que a doença enxerto contra hospedeiro se manifeste clinicamente. Para isso faremos a retirada de pequenas amostras de pele no tamanho de 2,5 mm, que serão coletadas nos dias -8 (antes do transplante), 0 (dia do transplante) e nos dias +14, +28 e +100 (após o transplante).

### **Riscos:**

O presente estudo não oferece nenhum risco para o paciente, pois esse procedimento faz parte da rotina do serviço do CEMO.

**“AVALIAÇÃO PRECOCE DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO ATRAVÉS DE EXAME HISTOPATOLÓGICO DA PELE E IMUNOHISTOQUÍMICA SERIADAS.”**

**TERMO DE CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO:**

Concordo em ser submetido as biópsias de pele necessárias, desde que seja respeitado sempre a confidencialidade dos dados contidos na ficha, bem como a minha identidade.

Entendo que não receberei nenhuma compensação financeira, ou qualquer tipo de doação, pela participação no estudo.

Confirmo ter lido e entendido completamente todas as informações, a natureza do estudo e voluntariamente concordo em participar do mesmo.

**Nome do(a) paciente:** \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Assinatura do(a) doador(a): \_\_\_\_\_ data: / /

**Nome da testemunha:** \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /

**Nome do(a) profissional responsável pela biópsia:** \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /

**Nome do(a) pesquisador(a) responsável:** \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /



## **Anexo 4**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de sangue periférico**

## **Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecimento aos Pacientes**

É necessário que o (a) senhor (a) leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, caso o (a) senhor (a) não entenda qualquer palavra ou informação, por favor peça explicações detalhadas para o profissional do serviço.

**Nome do estudo:** “AVALIAÇÃO DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA ATRAVÉS DE EXAMES ESPECÍFICOS DE SANGUE.”

### **Objetivo do estudo:**

A doença enxerto contra hospedeiro aguda é uma das complicações mais importantes que ocorre após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea). Pode se manifestar na pele com o aparecimento de manchas vermelhas na face, tronco e membros, assim como em outros órgãos como o fígado, a boca, o estômago, o intestino e os pulmões. Se utilizam medicações na prevenção desta complicação. O tratamento em geral é feito com medicações que diminuem a imunidade do paciente, aumentando o risco de infecções

O objetivo principal deste estudo é verificar a variação das populações celulares sanguíneas em dias pré-selecionados, além de analisar a variação de substâncias secretadas por essas populações. Para tal, é necessário que se retire amostras de sangue do paciente antes e após o transplante nos dias D-8 e D0 (pré-transplante), e nos dias D+14, D+28, D+45, D+100, D+180 e D+360 (pós-transplante).

### **Riscos:**

O presente estudo não oferece nenhum risco para o paciente, pois esse procedimento faz parte da rotina do serviço do CEMO.

**Confidencialidade:**

Todos os dados provenientes deste estudo e relativos aos pacientes serão processados de forma anônima, sem o nome ou endereço dos participantes. A proteção dos dados será inteiramente garantida mesmo em caso de publicação em revistas científicas.

**Participação Voluntária:**

O seu consentimento para a participação no estudo é livre e voluntário e não haverá nenhuma forma de pagamento. Também não existirão custos por parte do paciente para que seja realizado o estudo. Por ser uma participação voluntária, o (a) senhor (a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não dê a sua autorização.

**Em caso de dúvidas:**

Em caso de dúvidas, entrar em contato com a Dra. Adriana Scheliga do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, no telefone 3233-1353, ou com o pesquisador responsável por esse estudo, o Dr. Luis Fernando da Silva Bouzas, no CEMO/INCA, no telefone 2506-6215.

**“AVALIAÇÃO DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA ATRAVÉS DE EXAMES ESPECÍFICOS DE SANGUE.”**

**TERMO DE CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO**

Concordo em doar uma pequena quantidade do meu sangue para pesquisa, desde que seja sempre respeitada a confiabilidade dos dados contidos na ficha, bem como a minha identidade.

Entendo que não receberei nenhuma compensação financeira, ou qualquer tipo de doação, pela participação no estudo.

Confirmo ter lido e entendido completamente todas as informações, a natureza do estudo e voluntariamente concordo em participar do mesmo.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do profissional responsável pela coleta: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)