

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL10, IL12, IL17 E STLR2
E SUA RELAÇÃO COM COMPLICAÇÕES EM
PACIENTES SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA EM
ALTA DOSE COM RESGATE DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS PROGENITORAS AUTÓLOGAS**

LUCIANE NOGUEIRA MACHADO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Machado, Luciane Nogueira

Avaliação dos níveis de IL10, IL12, IL17 e sTLR2 e sua relação com complicações em pacientes submetidos à quimioterapia em alta dose com resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas / Luciane Nogueira Machado – São Paulo, 2012.

102p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS. 2. MEDIÇÃO DE NÍVEIS. 3. COMPLICAÇÕES. 4. QUIMIOTERAPIA.

DEDICATÓRIA

ao meu marido
e aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao meu orientador, Dr Vladimir Claudio Cordeiro de Lima, que acreditou no meu potencial e me concedeu esta oportunidade. Pessoa a quem eu sempre admirei pela inteligência e senso crítico.

A Dra. Leila Maria Magalhães Pessoa de Melo, Dr. Celso Arrais Rodrigues da Silva e Dra Marilene Hohmuth Lopes pelo carinho e pela indispensável contribuição para o enriquecimento desta obra.

Aos pacientes, que mesmo enfrentando um momento difícil em suas vidas, em um gesto altruísta aceitaram contribuir para o desenvolvimento da ciência.

Aos meus amigos sinceros e queridos Alessandra Sudré, Ana Maria Matias Leite, Andreia Cincinato, Carla Pinheiro, Cleiton Senhor, Elaine Breves, Gralcy Tobias Takaki, Luis do Vale, Marcílio F. dos Santos, Sabrina Barduzzi Rosatto, Silvia Freitas Bastos e Tais Ribeiro, que realizaram as coletas da maior parte das minhas amostras. Que em meio a rotina intensa de trabalho na unidade de transplante, encontraram meios de colaborar, tornando possível a realização desta pesquisa.

A Vanessa de Oliveira Camandoni, amiga de todas as horas e companheira de trabalhos científicos, que coordenou as coletas de amostras e me ajudou em tudo que estava a seu alcance.

A Karen Cristina Migotto, querida amiga, quase uma filha... que com toda dedicação que lhe é peculiar, doou alguns de seus preciosos finais de semana para me ajudar com ELISAs.

A Dra. Juliana Monte Real, que me abriu as portas e com todo carinho me recebeu. Que muito me ensinou e inspirou com seu conhecimento.

A Mariana Morato Marques por seus tão preciosos ensinamentos e Graziela Spilborghs pelo carinho e todo auxílio prestado no laboratório.

A minhas amigas de estudo Ana Carolina Ferreira, Ana Lucia Teodoro, Kelly Siqueira de Souza e Luciana Facure Macedo, que me fizeram companhia nesta jornada.

A todos os médicos do departamento de Oncologia Clínica, que sempre confiaram em minha capacidade, me incentivaram, e muito me ensinaram ao longo dos anos. Grande parte do que sei sobre oncologia e transplante de medula, devo a estes amigos queridos com os quais tive a felicidade de conviver durante muitos anos.

A Suely Francisco pelo carinho e pela paciência com minha “síndrome da última hora”.

A Ana Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Barros por todo auxílio e compreensão.

Agradeço ainda, aos meus mais novos amigos e companheiros de Sírion Libanês, que seguraram as pontas para que eu pudesse fazer meus

experimentos em laboratório, me proporcionaram folgas para que eu pudesse escrever, enfim, que muito me apoiaram para que eu pudesse concluir este trabalho.

Agradeço ao meu amado esposo, a pessoa que mais confiou no meu talento, me amparou nos momentos difíceis e que tanto colaborou em todas as fases deste trabalho.

Aos meus pais, minhas jóias mais preciosas, que tanto abriram mão em prol deste trabalho, e que tanto torceram por mim ao longo desta jornada.

Por fim, agradeço a Deus que me inspirou... leu... escreveu e realizou através de mim, resultando nesta obra.

Muito Obrigada!

RESUMO

Machado LN. **Avaliação dos níveis de IL10, IL12, IL17 e sTLR2 e sua relação com complicações em pacientes submetidos à quimioterapia em alta dose com resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Complicações decorrentes da quimioterapia de alta dose com resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas são especialmente resultantes do dano direto dos agentes utilizados no condicionamento sobre os órgãos e sistemas. A liberação de citocinas decorrente desta injúria pode ser responsável pela patogênese de muitas destas complicações, mas ainda necessita ser melhor investigada.

Objetivo: Avaliar os níveis séricos de IL10, IL12, IL17 e sTLR2, e sua relação com as complicações mais frequentes durante o TCTH: febre, mucosite, diarreia, insuficiência respiratória e sepse. **Metodologia:** Estudo de coorte prospectiva, que incluiu 60 pacientes, com diagnóstico de mieloma múltiplo (MM), linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH), submetidos à TCTH, no período de maio de 2010 a setembro de 2011. As concentrações de IL10, IL12, IL17 e sTLR2 nas amostras de soro foram medidas utilizando-se ELISA de captura e correlacionadas com as características clínicas, de tratamento e com os eventos supracitados. **Resultados:** A média de idade foi de 50,6 anos (16-72), com 53% do sexo feminino. Quarenta e oito por cento tinha diagnóstico de MM e 52% encontrava-se em resposta completa. Trinta e oito por cento apresentava ECOG 0 e o índice de comorbidade específico (HCT-CI) foi de 0 para 52 pacientes. Observamos 132 eventos de interesse do estudo; destes, 98 tiveram amostras coletadas para análises

das proteínas, sendo 54 eventos de febre, 31 de diarreia e 13 de mucosite. A ocorrência de diarreia esteve associada com o diagnóstico de mieloma múltiplo ($p=0,008$) e com a realização prévia de radioterapia ($p=0,051$) e o uso de antifúngico foi associado com sepse ($p=0,034$). A elevação de sTLR2 esteve associada com a ocorrência de diarreia, mucosite e febre, e apresentou correlação com o tempo de internação. As outras proteínas avaliadas não estiveram associadas com nenhum dos desfechos. **Conclusão:** Pacientes com mieloma e aqueles submetidos a radioterapia tem maior potencial para a ocorrência de diarreia durante o transplante. Elevação de sTLR2 está associada com desenvolvimento de febre, mucosite e diarreia.

SUMMARY

Machado LN. [IL10, IL12, IL17 and sTLR2 serum quantification and its association with complications in patients submitted to high dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation]. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Complications due to high dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) occur specially owing to the direct damage the drugs employed during conditioning cause on organs and systems. The cytokines released during this injury can be responsible for the pathogenesis of many of these complications, and needs further investigation. **Objectives:** Quantify serum IL10, IL12, IL17 and sTLR2 and test their association with the most common complications during ASCT: fever, mucositis, diarrhea, respiratory insufficiency and sepsis. **Methods:** This is a prospective cohort that included 60 patients diagnosed with multiple myeloma (MM), Hodgkin's lymphoma (LH) and non-Hodgkin lymphoma (NHL), submitted to ASCT. IL10, IL12, IL17 and sTLR2 serum concentration was determined by sandwich ELISA. Their association with clinical and treatment characteristics, as well as, with the above mentioned complications was tested. **Results:** Median age was 50,6 years-old (16-72), with 53% female. 48% had a MM diagnosis and 52% were in complete response. 38% was ECOG-0 and the specific comorbidity index (HCT-CI) was 0 for 52 patients. 132 events were observed. We collected 98 serum samples, 54 during fever, 31 during diarrhea and 13 during mucositis. The occurrence of diarrhea was associated with multiple myeloma ($p=0,008$) and with radiotherapy ($p=0,051$) and the use of antifungal

treatment was associated with sepsis. sTLR2 elevation was associated with diarrhea, mucositis and fever, and was correlated with the duration of hospitalization. The other proteins were not associated with the complications analyzed. **Conclusion:** Myeloma patients and those undergoing radiotherapy has greater potential for the occurrence of diarrhea during the transplant. sTLR2 elevation is associated with the development of fever, mucositis and diarrhea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do transplante.....	2
Figura 2	Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta.....	58
Figura 3	Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta.....	59
Figura 4	Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta.....	60
Figura 5	Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta.....	63
Figura 6	Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta.....	64
Figura 7	Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta.....	65
Figura 8	Correlação entre a variação da concentração de sTLR2 entre a admissão e a alta e o tempo de pega medular (teste de Spearman)....	68
Figura 9	Correlação entre o tempo de hospitalização e a variação da concentração de sTLR2 entre a admissão e a alta (teste de Spearman).....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estadiamento de Durie-Salmon.....	4
Quadro 2	Sistema Internacional de Estadiamento (ISS).....	4
Quadro 3	Sistema de Estadiamento de Ann Arbor.....	7
Quadro 4	Índice Prognóstico Internacional (IPI).....	8
Quadro 5	Escore de Prognóstico Internacional - IPS.....	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Kits (R&D Systems) e as concentrações utilizadas dos anticorpos e proteínas.....	37
Tabela 2	Distribuição dos pacientes quanto às características demográficas e patológicas.....	43
Tabela 3	Distribuição dos pacientes quanto a dados do estadiamento dos linfomas ao diagnóstico.....	44
Tabela 4	Distribuição dos pacientes quanto ao estadiamento do Mieloma Múltiplo.....	44
Tabela 5	Distribuição dos pacientes quanto ao tratamento prévio ao transplante.....	45
Tabela 6	Distribuição dos pacientes quanto às comorbidades.....	46
Tabela 7	Distribuição dos pacientes quanto ao escore HCT -CI.....	46
Tabela 8	Distribuição dos pacientes quanto ao performance status.....	46
Tabela 9	Principais informações sobre o transplante. Inclui esquemas quimioterápicos, necessidade de terapia intensiva, suporte nutricional parenteral e uso de antimicrobianos.....	48
Tabela 10	Infecções e agentes identificados.....	49
Tabela 11	Tempo de pega medular e tempo de hospitalização.....	50
Tabela 12	Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de febre.....	51

Tabela 13	Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de diarreia.....	52
Tabela 14	Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de mucosite.....	52
Tabela 15	Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de sepse	53
Tabela 16	Relação entre a ocorrência dos eventos e o tempo de pega medular...	53
Tabela 17	Relação entre e a ocorrência dos eventos e o tempo de hospitalização.....	53
Tabela 18	Concentração de IL10 na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início dos eventos e na alta hospitalar.....	61
Tabela 19	Concentração de sTLR2 na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início dos eventos e na alta hospitalar.....	66
Tabela 20	Variação da concentração de sTLR2 na admissão e na alta segundo as variáveis clínicas.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ADM	Admissão
AP1	Fator de transcrição abreviado do inglês <i>activator protein 1</i>
APACHE	Abreviação em inglês de escore de avaliação fisiológica aguda e crônica de saúde
BEAM	Esquema quimioterápico composto por carmustina, etoposídeo, citarabina e melfalano
BSA	Abreviação em inglês de albumina sérica bovina
CBV	Esquema quimioterápico composto por carmustina, etoposídeo e ciclofosfamida
CCNU	Lomustina
CTX	Ciclofosfamida
DEXA	Dexametasona
CHP	Células hematopoiéticas progenitoras
CIBMTR	abreviação do inglês <i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
DO	Densidade óptica
DM	Diabetes mellitus
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DS	Durie-Salmon
EC	Estádio clínico
ECOG	Escala de performance status abreviada do inglês <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAZ	Receptor transmembranar membro da família dos fatores de necrose tumoral
FASL	Fas ligante
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
H₂O₂	Água oxigenada
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCT-CI	<i>Hematopoietic cell transplantation–specific comorbidity index</i>
HLA	Abreviação em inglês de antígeno leucocitário humano
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
Ico	Insuficiência coronariana
IFNG	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IRC	Insuficiência renal crônica
IRF3	Fator regulador 3 de interferon
ISS	International staging system
KC	Abreviação em inglês de quimiocina derivada de queratinócito
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilodáton
KH₂PO₄	Monofosfato de potássio
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LPS	Lipopolissacarídeo
MEL	Melfalano
mg/dl	miligramas por decilitro
mg/m²	miligramas por metro quadrado
MM	Mieloma Múltiplo
ml	Mililitro
mm	Milimol
mm³	Milímetro cúbico

mmHg	Milímetro de mercúrio
MyD88	Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NFKB	Fator nuclear kappa B
ng/ml	Nanograma por mililitro
NK	Células natural killer
Nm	Nanômetro
NO	Abreviação em inglês de óxido nítrico
NOD	Abreviação do inglês <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NPP	Nutrição parenteral prolongada
°C	Grau Célsius
PAMP	Abreviação em inglês de padrão molecular associado a patógeno
PRR	Abreviação em inglês de receptor de reconhecimento de padrão
PCR	Proteína C-reativa
PCT	Procalcitonina
pg/ml	Picogramas por mililitro
PMN	Célula polimorfonuclear
PaCO₂	Pressão arterial de gás carbônico
PaO₂	Pressão arterial de oxigênio
PBS	Abreviação em inglês de salina tamponada com fosfato
IPi	Abreviação do inglês <i>International Prognostic Index</i>
PTX3	Pentraxina3
QUIMIO	Quimioterapia
RADIO	Radioterapia
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	Abreviação do inglês <i>Sterile-alpha and armadillo adaptor motif-containing protein</i>
SatO₂	Saturação de oxigênio
sCD14	Forma solúvel do receptor de LPS

sIL-2R	Receptor solúvel de interleucina 2
SOS	Síndrome da oclusão sinusoidal
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
sTLR2	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 2 solúvel
sTNFR	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral
Th	Linfócito T auxiliar
TIR	Abreviação do inglês <i>Toll/interleukin-1 receptor-like</i>
TIRAP/Mal	Molécula adaptadora da via de sinalização Toll
TLR	Receptor toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	Abreviação do inglês <i>TRIF related adaptor molecule</i>
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TRIF	Abreviação do inglês <i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
VAD	Esquema quimioterápico composto por vincristina, doxorubicina e dexametasona
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Indicações do Transplante Autólogo.....	2
1.1.1	Mieloma Múltiplo	3
1.1.2	Linfomas	5
1.1.3	Leucemias	11
1.1.4	Tumores Sólidos	11
1.1.5	Doenças não-malignas	12
1.2	Complicações Associadas ao TCTH.....	12
1.3	Citocinas.....	16
1.4	Inflamação, Citocinas e TMO.....	17
1.4.1	Interleucina 12.....	21
1.4.2	Interleucina 10.....	23
1.4.3	Interleucina 17.....	25
1.4.4	sTLR2	26
1.4.5	Proteína C reativa (PCR).....	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo Primários	31
2.2	Objetivos Secundários.....	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	Casuística	34
4.2	Definição dos Eventos	34
4.3	Coleta e Processamento das Amostras de Sangue	35
4.4	Quantificação das Citocinas.....	36
4.4.1	Método ELISA (<i>enzyme linked immunoabsorbent assay</i>) de captura	37
4.5	Análise Estatística	40

5	RESULTADOS	42
5.1	Características Clínicas e Demográficas da Amostra	42
5.2	Dados Relevantes sobre o Transplante	47
5.3	Resultados das Análises das Variáveis Clínicas e sua Relação com a Ocorrência dos Eventos	50
5.4	Resultados das Análises das Proteínas Séricas	54
5.4.1	Interleucina 12.....	55
5.4.2	Interleucina 17.....	55
5.4.3	Interleucina 10.....	56
5.4.4	sTLR2	62
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES	85
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ANEXOS

Anexo 1 Escala de Comorbidade

Anexo 2 Ficha de Coleta de Dados

Anexo 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 4 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células hematopoiéticas foi utilizado inicialmente por THOMAS et al. em 1957, para o tratamento de doenças hematológicas (THOMAS et al. 1957) com o intuito de substituir o tecido hematopoiético doente. Desde então, vem sendo largamente utilizado para o tratamento de uma grande variedade de doenças. Atualmente, cerca de 50 mil transplantes são realizados no mundo, a cada ano, para o tratamento de doenças neoplásicas, metabólicas e deficiências imunológicas (PASQUINI e WANG 2011).

O procedimento consiste na substituição do sistema hematopoiético do paciente por células obtidas de doador *Human Leukocyte Antigen* (HLA) compatível (transplante de células tronco hematopoiéticas – TCTH) alogênico, ou por células do próprio paciente - TCTH autólogo, coletadas e preservadas antes do uso dos agentes citotóxicos empregados no condicionamento (quimioterapia em alta dose e radioterapia administradas previamente à infusão das células hematopoiéticas progenitoras) (CUTLER e ANTIN 2005).

O racional do transplante autólogo é permitir a intensificação terapêutica com o emprego de altas doses de quimioterapia, por vezes associada à irradiação corporal total, para atingir melhores taxas de resposta (BUCHMANN et al. 2009).

O TCTH consiste na administração de quimioterapia em doses altas, normalmente com esquemas contendo algum alquilante, seguida de um intervalo sem quimioterapia de 24 a 48 horas e, posteriormente, da infusão de células hematopoiéticas progenitoras (CHP) obtidas do próprio paciente através de punção

da medula óssea ou de aférese de CHP circulantes, mobilizadas da medula óssea com fatores de crescimento (G-CSF, plerixafor) associados ou não à quimioterapia. Normalmente se observa então um período de aplasia medular, quando, potencialmente, ocorrem as complicações como infecções, sangramentos e mucosite, seguido da pega (recuperação da função medular com neutrófilos circulantes $>500/\text{mm}^3$ e plaquetas $>20.000/\text{mm}^3$) e reversão das demais complicações.

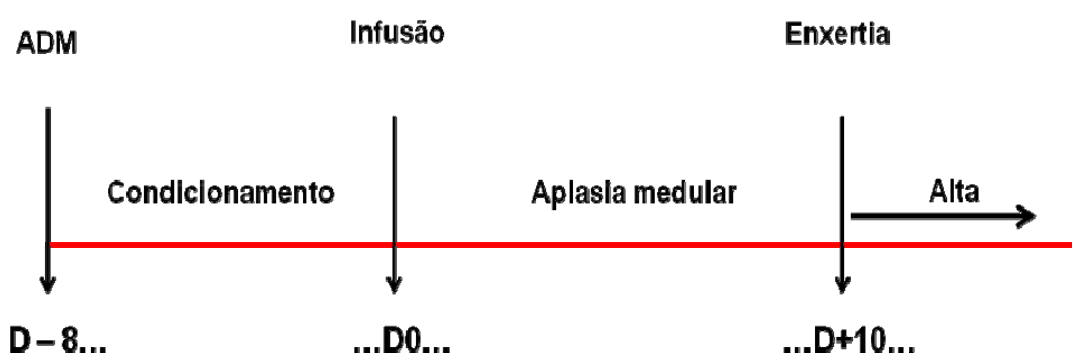


Figura 1 - Representação esquemática do transplante. ADM: momento da admissão do paciente para início de transplante; condicionamento: período de administração dos agentes citotóxicos (período contado em dias negativos, onde o número de dias é variável de acordo com o esquema proposto); infusão: momento da infusão das células progenitoras hematopoiéticas; aplasia medular: período de tempo variável onde se apresenta ablação da medula óssea; enxertia: momento considerado a pega medular (primeiro de 3 dias consecutivos com contagens de granulócitos ≥ 500 células/ mm^3); Alta: alta hospitalar; D: dias de transplante.

1.1 INDICAÇÕES DO TRANPLANTE AUTÓLOGO

O uso de TCTH para o tratamento de algumas doenças já é bem estabelecido e considerado tratamento padrão, enquanto para outras ainda é considerado experimental. As indicações mais comuns para o TCTH foram, segundo dados coletados pelo *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR) em 2010, o Mieloma Múltiplo (MM), seguido por Linfoma Não-Hodgkin (LNH) e o Linfoma de Hodgkin (LH) (PASQUINI e WANG 2011).

1.1.1 Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo é uma doença maligna hematológica que resulta da proliferação neoplásica de um único clone plasmocitário, produtor de imunoglobulinas monoclonais. A proliferação difusa das células plasmáticas na medula óssea ou seu acúmulo nos ossos formando múltiplas lesões líticas, resultam nas características clínicas da doença: anemia, dor óssea, hipercalcemia, falência renal e imunodeficiência (HODGSON 2008). Sua etiologia não é conhecida, mas está claro que envolve múltiplas e complexas alterações cromossômicas (FONSECA 2004), podendo ser associadas à exposição prévia à radiação, certas substâncias químicas, como produtos petrolíferos, ou evoluir a partir de uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) (HODGSON 2008). O mieloma é classificado de acordo com o tipo de imunoglobulina que se encontra aumentada, em IgG, IgA, IgM; e ainda em kappa ou lambda dependendo da cadeia leve envolvida. (BAITALLE e HAROUSSEAU 1997). Para o estadiamento dos mielomas os critérios mais usados são os de Durie-Salmon (DURIE e SALMON 1975) e o Sistema de Estadiamento Internacional - ISS (GREIPP et al. 2005).

Quadro 1 - Estadiamento de Durie-Salmon

Estádio	Critérios
	Baixa massa tumoral ($< 0,6$ células $\times 10^{12}/m^2$)
	Todos os seguintes:
	Hb > 10 g/dl; cálcio normal
I	IgG < 5 g/dl, IgA < 3 g/dl.
	Proteína urinária monoclonal < 4 g/24h
	Ausência ou lesão óssea única
II	Intermediário (entre os estádios II e III)
	Alta massa tumoral ($1,2$ células $\times 10^{12}/m^2$)
	Qualquer um dos seguintes:
III	Hb $< 8,5$ g/dl; cálcio > 12 mg/dl; IgG > 7 g/dl,
	IgA > 5 g/dl, proteína urinária monoclonal > 12 g/24h
	Múltiplas lesões osteolíticas, fraturas
Subclasse	A – se creatinina < 2 mg/dl
	B – se creatinina ≥ 2 mg/dl

Quadro 2 - Sistema Internacional de Estadiamento (ISS)

Estádio I	$\beta 2$ microglobulina sérica $< 3,5$ mg/dl
	Albumina sérica $> 3,5$ g/dl
Estádio II	Nem I nem III*
Estádio III	$\beta 2$ microglobulina sérica $> 5,5$ mg/dl
*Existem 2 categorias no estágio II:	
	$\beta 2$ microglobulina sérica $< 3,5$ mg/dl mas albumina sérica $< 3,5$ g/dl
	$\beta 2$ microglobulina sérica $> 3,5$ mg/dl mas albumina sérica $> 3,5$ g/dl

O Mieloma é uma doença considerada incurável, que apresenta uma mediana de sobrevida de aproximadamente 4 anos (SCHMIT-POKORNY 2009). Atualmente, o TCTH é o tratamento padrão, embora haja controvérsias quanto ao melhor momento para realização do transplante e quanto a sua eficácia (TAN et al. 2007; SCHMIT-POKORNY 2009). Nas recidivas, o TCTH é o tratamento recomendado e

com resultados superiores aos da quimioterapia convencional. Embora a sobrevida nestes casos seja similar à terapia convencional, o transplante pode reduzir a frequência de mielodisplasia causada pelos alquilantes convencionais (SCHMIT-POKORNY 2009) e melhorar a sobrevida livre de eventos. Um segundo transplante autólogo pode ser indicado nas recaídas, principalmente para pacientes com período livre de progressão maior que 18-24 meses após o primeiro transplante. Outra abordagem para casos de alto risco de recaída precoce após o primeiro transplante é a consolidação com transplante alogênico (PASQUINI e WANG 2011), pois em teoria agregaria o benefício do efeito enxerto contra a doença, podendo ainda se utilizar de um esquema de condicionamento de menor intensidade. De qualquer modo, a resposta à terapia inicial parece ser crucial para o sucesso do tratamento, e neste sentido, esforços têm sido feitos no desenvolvimento e incorporação de novos agentes aos esquemas terapêuticos de indução, como novos imunomoduladores e inibidores de proteassoma, entre outros, contribuindo para o aumento da sobrevida global (SCHOTS 2011).

1.1.2 Linfomas

Os linfomas são neoplasias malignas que se originam nos órgãos linfóides. Podem ser definidos como um acúmulo progressivo, de um único clone de células linfóides, resultantes de múltiplas alterações genéticas que ocorrem no genoma da célula (KLUMB 2001). Em 85% dos casos ocorre a expansão clonal maligna de células B e em 15% das células T (NOVAK et al. 2011). São divididos em duas categorias, linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin, de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, das células de Reed-Sternberg (RS) - célula

característica da doença de Hodgkin descrita por Sternberg na Áustria, em 1899, e Dorothy Reed nos Estados Unidos em 1902 (NOVAK et al. 2011).

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de desordens linfoproliferativas do sistema imunológico, classificados em diversos subtipos. A sintomatologia pode se apresentar com linfadenomegalias indolores axilares, cervicais e inguinais, e ainda com febre, sudorese noturna, perda de peso e prurido corporal. Além de sintomas associados a localização como dispneia, dores retroesternais, abdominais, entre outros (PINTER-BROWN e CASCIATO 2009). Dentre os possíveis fatores de risco estão deficiências imunológicas por doenças genéticas hereditárias, drogas imunossupressoras, agentes virais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV1), herpes vírus tipo 8 humano (HHV8), vírus da hepatite C (HCV), e ainda, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, exposição a agentes químicos, como pesticidas, solventes e fertilizantes, além da exposição a altas doses de radiação (PINTER-BROWN e CASCIATO 2009; NOVAK et al. 2011). Para o estadiamento dos linfomas, o sistema mais comumente usado é a classificação de Ann Arbor.

Quadro 3 - Sistema de Estadiamento de Ann Arbor

Estádio	CrITÉrios
I	Envolvimento de uma única cadeia ganglionar (I) ou de uma Órgão ou local extra ganglionar (IE)
II	Envolvimento de duas ou mais cadeias ganglionares do mesmo lado do diafragma (II) ou com contÍguo envolvimento de Órgãos extra ganglionares (IIE)
III	Envolvimento de cadeias ganglionares de ambos os lados do diafragma (III), que podem incluir o baço (IIIs) ou com extensão contÍgua a Órgãos extra ganglionares (IIIE) ou ambos (IIIEs)
IV	MÚltiplos ou disseminados focos de envolvimento de mais que um Órgão extra ganglionar com ou sem envolvimento linfático

É agregada uma subdivisão destes estÁgios aos pacientes que apresentam os chamados sintomas B, tais como febre, sudorese noturna, perda de peso significativa.

➤ **Linfoma não-Hodgkin**

Os Linfomas não-Hodgkin incluem mais de 20 tipos diferentes, podem ser divididos em dois grandes grupos: indolentes e agressivos. Os chamados indolentes apresentam crescimento relativamente lento. Os pacientes podem permanecer assintomáticos ou com poucos sintomas por vários anos. Entretanto, a cura nestes casos é menos provável do que nos pacientes com formas agressivas. Esses últimos podem levar rapidamente ao Óbito se não tratados, mas, em geral, são mais curáveis. Os linfomas indolentes correspondem aproximadamente a 40% dos diagnósticos, e os agressivos, aos 60% restantes (Ministério da Saúde 2012a).

Para avaliação prognóstica, é utilizado o Índice de Prognóstico Internacional

– IPI, onde quanto maior o número de fatores presentes maior a chance de progressão da doença e menor é o tempo de sobrevida global (Anonymous 1993).

Quadro 4 - Índice prognóstico internacional (IPI)

idade > 60 anos;
DHL aumentada
performance status diminuído (ECOG > 2)
estadiamento pela escala de Ann Arbor III or IV
mais de um sítio extranodal
Grupos de risco*
Risco baixo IPI = 0-1
Risco intermediário-baixo IPI = 2
Risco intermediário-alto IPI = 3
Risco alto IPI = 4-5

Existem outros índices prognósticos utilizados como o FLIPI, para o linfoma folicular, outras variações do IPI, como IPI ajustado à idade ou ajustado ao uso de rituximabe (anticorpo anti-CD20).

O tratamento dos LNH varia de acordo com o tipo histológico e com a agressividade clínica, de uma maneira geral, consiste do uso de drogas quimioterápicas e anticorpos monoclonais (NOVAK et al. 2011). A radioterapia é usada, em geral, para reduzir a carga tumoral em locais específicos, para aliviar sintomas relacionados ao tumor, ou também para consolidar o tratamento quimioterápico, diminuindo as chances de recaída em certos sítios no organismo mais propensos à recaída (Ministério da Saúde 2012a). Para os LNH difusos de grandes células B (LNH DGCB), o tipo mais frequente dentre os linfomas não-Hodgkin, o TCTH é considerado mais efetivo que a quimioterapia convencional e

recomendado para pacientes com doença quimiossensível em primeira recaída, ou em primeira remissão naqueles com risco alto/intermediário-alto segundo o *International Prognostic Index* (IPI) (PASQUINI e WANG 2011). Indica-se ainda o TCTH para LNH DGCB em primeira remissão parcial após um curso completo da terapia de indução e para aqueles considerados refratários ao tratamento convencional, mas ainda quimiossensíveis (PASQUINI e WANG 2011).

Para os linfomas foliculares, o TCTH é indicado quando se obtém uma resposta pobre à terapia inicial, uma remissão de curta duração (<12 meses), e na segunda recaída (PASQUINI e WANG 2011).

Pacientes com bom estado geral e sem comorbidades importantes, portadores de linfomas de células do manto também podem receber TCTH como tratamento de consolidação (KHOURI et al. 1998; PASQUINI e WANG 2011). Da mesma forma, vários grupos têm demonstrado que a administração de TCTH para indivíduos portadores de linfomas agressivos de células T aumenta a sobrevida global e sobrevida livre de doença, quando empregado como terapia de consolidação (RODRIGUEZ et al. 2003; KIM et al. 2007; NUMATA et al. 2010).

➤ **Linfoma de Hodgkin (LH)**

É responsável por cerca de 30% dos linfomas. É mais comum na idade adulta jovem, dos 15 aos 40 anos, atingindo maior frequência entre 25 a 30 anos. Uma característica dos LH é que eles tendem a disseminar por contigüidade, seguindo para áreas contíguas de linfonodos, disseminando difusamente apenas em estádios mais avançados. O local mais comum de envolvimento é o mediastino (Ministério da Saúde 2012b).

Para avaliação prognóstica de casos avançados, é utilizado o Escore de Prognóstico Internacional – IPS, onde quanto maior o número de fatores presentes maior a chance de progressão da doença e menor é o tempo de sobrevida global (HASENCLEVER e DIEHL 1998).

Quadro 5 - Escore de Prognóstico Internacional – IPS

sexo masculino
idade $\geq$ 45 anos
estádio IV
albumina sérica < 4 g/dL
hemoglobina $< 10,5$ g/dL
leucocitose $> 15.000/\text{mm}^3$
linfopenia $< 600/\text{mm}^3$ e/ou $< 8\%$
Grupos de risco*
Baixo 0-1
Baixo-intermediário 2
Alto-intermediário 3
Alto 4-5

*Atribuindo uma pontuação de (0-1) a cada variável, resulta nos grupos de risco

O tratamento do linfoma de Hodgkin pode incluir radioterapia isolada ou em combinação com quimioterapia (PINTER-BROWN e CASCIATO 2009). O uso do TCTH é considerado terapia padrão para pacientes com LH na recaída quimiossensível e pode ser realizado eventualmente para doença refratária, embora seu sucesso seja diretamente dependente do grau de sensibilidade a terapia de resgate pré-transplante (BARTLETT 2005). Dados do CIBMTR mostram que a presença de doença no momento do transplante, bem como o número de tratamentos

quimioterápicos anteriores, tem influência significativa na sobrevida após o transplante (PASQUINI e WANG 2011).

1.1.3 Leucemias

Nas leucemias agudas, o transplante autólogo é uma alternativa à quimioterapia com citarabina em alta dose para consolidação ou quando da ausência de doador alogênico (TAN et al. 2007; PASQUINI e WANG 2011), e em leucemias de alto risco, na ausência de doença residual mínima. Devemos salientar que não existem evidências que suportem um claro benefício desta conduta para esta doença (PASQUINI e WANG 2011).

Na leucemia linfóide crônica, o TCTH também pode ser considerado no contexto de estudos clínicos para pacientes de alto risco em remissão completa ou boa remissão parcial (SCHMIT-POKORNY 2009; PASQUINI e WANG 2011).

1.1.4 Tumores Sólidos

Cirurgia, em combinação ou não com quimioterapia ou radioterapia, é o tratamento de primeira escolha para a maior parte dos tumores sólidos. No entanto, o TCTH tem mostrado seu papel no tratamento de diversos tumores quimio-radiossensíveis como neuroblastoma, tumores de células germinativas, sarcomas de Ewing, entre outros (TAN et al. 2007; SCHMIT-POKORNY 2009). Segundo dados de países europeus, o número de transplantes para tumores sólidos tem oscilado nos últimos 15 anos. Transplantes para câncer de ovário, pulmão e mama têm declinado devido a resultados desapontadores dos estudos até agora realizados, por outro lado

vemos um aumento significativo para neuroblastoma e sarcoma de Ewing (GRATWOHL et al. 2004).

1.1.5 Doenças não-malignas

Uma grande variedade de desordens não-malignas é tratada com transplante de medula óssea. O transplante autólogo é realizado, principalmente, para doenças autoimunes, entre elas esclerose múltipla, lúpus eritematoso e artrite reumatóide de difícil controle ou refratárias aos tratamentos convencionais (TAN et al. 2007; SCHMIT-POKORNY 2009).

1.2 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO TCTH

O insucesso deste tratamento geralmente está relacionado à refratariedade ou à recidiva da doença de base, ou ainda, pode ser resultado da ocorrência de complicações, que, dependendo do condicionamento utilizado e da condição clínica do paciente, podem ser bastante significativas. Mesmo quando não associadas à mortalidade, as complicações agudas pós-transplante representam uma fonte importante de morbidade para o paciente.

As complicações podem ser resultantes do próprio procedimento ou serem resultado da ação direta dos agentes utilizados no condicionamento sobre os diversos órgãos e sistemas (PATON et al. 2000). A alta dose de quimioterapia utilizada no condicionamento é diretamente tóxica para todos os tecidos com alta taxa de divisão celular, e a liberação de citocinas resultante desta injúria pode ser responsável pela patogênese de muitas das complicações (CUTLER e ANTIN 2005).

A maioria dos pacientes candidatos a transplante é bastante pré-tratada com quimioterapia, com o objetivo de atingir a remissão da doença. O impacto disto na indução de inflamação ainda não está claro, mas há indicações de que tenha influência nos resultados do transplante. Os tecidos parenquimatosos podem ser sensibilizados para os efeitos potencialmente tóxicos do condicionamento pela terapia prévia, predispondo ao aumento da reação inflamatória nestes pacientes (CUTLER e ANTIN 2005).

A mucosa da boca e trato gastrointestinal são extremamente sensíveis aos efeitos deletérios da quimioterapia e radioterapia, resultando no desenvolvimento de mucosite, com perda da integridade da barreira mucosa, surgimento de ulcerações e comprometimento da imunidade local (CUTLER e ANTIN 2005; EILERS e MILLION 2007). Além de causar intenso desconforto ao paciente, interfere no seu estado sistêmico, principalmente nutricional, favorece infecções locais, e pode levar à infecção sistêmica, através da translocação de bactérias do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Esta translocação de microorganismos do intestino também leva a produção e liberação de citocinas inflamatórias (CUTLER e ANTIN 2005). A mucosite acomete cerca de 40% dos indivíduos que recebem quimioterapia e 75% a 100% entre os transplantados de medula óssea (WARDLEY et al. 2000). Vários fatores estão associados com um maior risco de desenvolvimento de mucosite grave em pacientes submetidos a TCTH, como exposição prévia à radiação, diagnóstico de linfoma não-Hodgkin e condicionamento com esquema contendo etoposídeo (BOLWELL et al. 2002).

Diarréia também é uma ocorrência frequente em transplantados de medula, e cerca de 80% dos pacientes desenvolvem esta complicação, tanto de origem

infecciosa, onde o *Clostridium difficile* figura como o agente etiológico mais comum, quanto de origem não-infecciosa, resultado do dano direto à mucosa intestinal (ANAISSIE 2010).

O fígado é frequentemente afetado, pela SOS (síndrome da oclusão sinusoidal), uma das complicações mais comuns (10% a 60%) e graves após o transplante. A alta dose de quimioterapia ou radioterapia, bem como as citocinas inflamatórias circulantes (CUTLER e ANTIN 2005), podem causar dano ao endotélio sinusoidal hepático, produzindo hepatomegalia, dor no quadrante superior direito, icterícia e retenção de líquido, com aumento de peso. A forma grave, freqüentemente resulta em falência de múltiplos órgãos e morte (KUMAR et al. 2003).

Os pulmões são importantes alvos da toxicidade do condicionamento, sendo que 10% a 50% dos pacientes desenvolvem insuficiência respiratória. Dentre os principais fatores de risco observamos a atividade da doença maligna no momento do transplante e a idade mais avançada (CRAWFORD e PETERSEN 1992; KOTLOFF et al. 2004). As causas mais comuns são hemorragia alveolar e a pneumonite idiopática, que apresentam alta taxa de mortalidade, e a síndrome da pega do enxerto. A etiologia e fisiopatologia destas formas de dano pulmonar envolvem a ativação da cascata inflamatória pela ação da quimioterapia/radioterapia usada no condicionamento (KOTLOFF et al. 2004; CUTLER e ANTIN 2005). Além disso, o uso de fator estimulador de crescimento de granulócitos para a redução do período de neutropenia também tem contribuído para o aumento das complicações inflamatórias. Cerca de 23% daqueles que desenvolvem insuficiência respiratória

necessitam de ventilação mecânica, o que está associado com menor sobrevida (KOTLOFF et al. 2004).

Uma das complicações mais comuns que acomete os pacientes submetidos ao TCTH é a infecção, que ocorre em mais de 75% dos casos e apresenta taxas de mortalidade entre 5% a 10% no transplante autólogo (OFFIDANI et al. 1999). Esta alta incidência de infecções se deve, principalmente, ao período de neutropenia e representa um dos maiores obstáculos ao sucesso dos transplantes. Em uma série com 117 pacientes submetidos à TCTH para tumores hematológicos (mieloma múltiplo e linfoma) e tumores sólidos observou-se que 63% tiveram febre com necessidade do uso de antibióticos, e 35,4% foram classificadas como febre de origem indeterminada. Neste estudo não se encontrou diferença na frequência e tipo de infecções entre indivíduos com tumores hematológicos e tumores sólidos (REICH et al. 2001). A maioria das infecções em pacientes neutropênicos é causada por bactérias gram-positivas, seguido de bactérias gram-negativas (na nossa instituição a maioria das infecções nesta população é causada por bactérias gram-negativas – dados não publicados), embora só seja possível o isolamento de um agente causal em 20-30% dos casos (FREIFELD et al. 2011).

A neutropenia, definida como a contagem de granulócitos $<1500/\text{mm}^3$, no TCTH dura em média 12 dias e resulta da ação dos agentes citotóxicos causando ablação da medula óssea e predispondo o paciente às infecções. Neste período, é comum a ocorrência de febre. Cerca de 80% dos pacientes desenvolve neutropenia febril, o que constitui a principal síndrome observada no pós-transplante (OFFIDANI et al. 1999). Esta decorre, na maior parte das vezes da translocação bacteriana de agentes procedentes do trato gastrointestinal acometido pela mucosite, especialmente

as bactérias gram-negativas, ou por agentes provenientes do uso dos cateteres centrais de longa permanência, principalmente os estafilococos e as micobactérias atípicas (OFFIDANI et al. 1999). A evolução para uma resposta sistêmica à infecção (sepse) ocorre em 30 a 40% dos pacientes no pós-transplante (LJUNGMAN et al. 1995).

Aproximadamente 20 a 40% dos pacientes necessitam de cuidados intensivos (BARNES e STALLARD 2001), o que está associado a um prognóstico desfavorável. Dentre os principais eventos que demandam estes cuidados estão: insuficiência renal aguda (20%), infecção (16%), insuficiência respiratória (14%), insuficiência cardíaca (9,7%) (SCALES et al. 2008).

Tem sido de grande interesse a investigação de marcadores que possam ser confiáveis na detecção precoce das complicações em TCTH, devido ao impacto que representam na morbidade e mortalidade relacionada ao tratamento. Diversos pesquisadores discutem a utilidade das proteínas de fase aguda e citocinas como ferramentas diagnósticas e prognósticas na neutropenia febril, como preditores de infecção grave e detecção precoce de outras complicações (FERRÀ et al. 1998; SAUER et al. 2000; MIN et al. 2001; PRAT et al. 2008).

1.3 CITOCINAS

As citocinas fazem parte de um grupo de proteínas e glicoproteínas capazes de modular a atividade e a função de células e tecidos, tanto em condições fisiológicas, como patológicas. Sua produção e liberação ocorrem em resposta a estímulos produzidos por microorganismos e outros antígenos, e promovem diversas

atividades das células envolvidas na imunidade e na inflamação. Na fase de ativação da resposta imune, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação dos linfócitos, e, na fase efetora da imunidade inata e adquirida, elas ativam diferentes células efetoras para eliminar microorganismos e outros antígenos, além de atuarem no desenvolvimento das células hematopoiéticas (MIN et al. 2001).

As citocinas não ficam normalmente estocadas, sua síntese e liberação são iniciadas a cada vez por uma nova transcrição gênica, resultado de uma nova ativação celular. Esta transcrição é um evento transitório, pois os RNAs mensageiros que codificam a maioria das citocinas são instáveis. Uma vez sintetizadas, são rapidamente secretadas (MIN et al. 2001).

As principais citocinas que participam dos processos celulares e moleculares associados aos fenômenos inflamatórios são a IL1, IL6, TNFA e alguns membros da família das quimiocinas.

1.4 INFLAMAÇÃO, CITOCINAS E TMO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e exerce um papel fundamental na ativação e orquestração da resposta imune adaptativa para manutenção da integridade e reparo dos tecidos (GORDON 2002). Mecanismos de defesa inatos incluem o reconhecimento de patógenos e de tecidos danificados mediado por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, PRRs) celulares e humorais. Esses receptores são capazes de reconhecer estruturas altamente conservadas presentes nos microrganismos conhecidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (TAKEUCHI e AKIRA 2010).

Os PRRs celulares pertencem a diferentes grupos estruturais e funcionais, que incluem receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), receptores de remoção ou *scavengers*, receptores de lecitinas, receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), entre outros (BEUTLER 2004).

A família TLR é uma das famílias de PRRs mais bem caracterizada e é responsável por perceber patógenos invasores extracelulares e em endossomos e lisossomos intracelulares (LEE e KIM 2007). Essas proteínas se caracterizam pela porção N-terminal rica em leucinas (LRRs) e por uma região transmembrana seguida por um domínio de homologia Toll/IL-1R (TIR). Dez TLRs foram identificados em humanos e cada uma dessas moléculas reconhece determinados padrões moleculares expressos por patógenos, sendo que TLR2 e TLR4 são os principais responsáveis pelo reconhecimento de produtos bacterianos e de fungos (TLR2 – lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicóico, zymosan; e TLR4 – lipopolissacarídeo) (KIRSCHNING e SCHUMANN 2002, VASSELON et al. 2005 TAKEUCHI et al. 1999), além de serem os TLRs mais frequentemente envolvidos em respostas inflamatórias contra agentes não-microbianos, como produtos liberados por células necróticas. Estes receptores interagem com vários adaptadores intracelulares que contém o domínio TIR como MyD88, TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*), TIRAP/Mal, TRAM (*TRIF related adaptor molecule*) e SARM (*Sterile-alpha and Armadillo adaptor motif-containing protein*) (TAKEDA e AKIRA 2004). O complexo ligante, receptor e molécula adaptadora ativa fatores de transcrição como NF κ B, AP1 e IRF3 e promovem a transcrição de citocinas (TNFA, IL12, IL6) e interferons que promovem e modulam a resposta imune (ARBIBE et al. 2000; PARKER et al. 2007).

Os PRRs são moléculas extremamente conservadas ao longo da evolução e reconhecem produtos microbianos que são essenciais para sobrevivência destes organismos e que, conseqüentemente, têm pouca probabilidade de sofrer mutação (PAMPs) (ABBAS et al. 2010). Os PRRs humorais também apresentam diversidade estrutural e funcional e dentre eles estão as colectinas (lecitina ligadora de manose, proteína surfactante A e D), ficolinas, componentes do complemento e as pentraxinas (KIM et al. 2007).

Grande parte dos estudos desenvolvidos com marcadores inflamatórios em TMO, foram em séries de transplantados alogênicos. Os resultados dos mesmos têm demonstrado existir uma relação do aumento de IL6 e IL8 com complicações pós-TMO, tais como o desenvolvimento de febre, mucosite, disfunção renal e pulmonar. Estes eventos parecem desencadear a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. A IL6 tem sido útil na detecção de infecção mesmo em pacientes em aplasia medular, pois células de origem não-hematopoiética assumem a produção desta citocina (PECHUMER et al. 1995), e seus níveis elevados parecem estar associados a uma menor sobrevida pós-TMO (FERRÀ et al. 1998; MIN et al. 2001).

O interesse na investigação dos processos inflamatórios relacionados às complicações resultantes do transplante de células-tronco hematopoiéticas tem sido grande desde a década de 90, no entanto em revisão da literatura observa-se que 20 trabalhos foram realizados com coortes de pacientes submetidos a transplante alogênico, outros 3 envolvendo simultaneamente transplantes autólogos e alogênicos, e apenas 2 estudaram especificamente inflamação nos transplantes autólogos. Dentre as complicações analisadas, maior ênfase foi dada àquelas de maior complexidade e que representam maior gravidade e, conseqüentemente, relacionam-se a índices

elevados de óbito, como a doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa), SOS e síndrome do extravasamento capilar. As citocinas e proteínas de fase aguda avaliadas nestes estudos foram: PCR (SCHOTS et al. 1998, 2002, 2003; ORTEGA et al. 2004; BLIJLEVENS et al. 2005; PIHUSCH et al. 2006; SCHMIDT et al. 2007; FUJI et al. 2008; MCNEER et al. 2010), PCT (BLIJLEVENS et al. 2000; PIHUSCH 2006; ORTEGA et al. 2006; SCHMIDT et al. 2007), sIL-2R (FOLEY et al. 1998), IL-6 (PECHUMER et al. 1995; MIN et al. 2001; SCHOTS et al. 2003; ANDERSEN et al. 2005; MOHTY 2005; PIHUSCH et al. 2006; FUJI et al. 2008), IL-7 (SINHA et al. 2002) IL-8 (MIN et al. 2001; SCHOTS et al. 2003; ANDERSEN et al. 2005; MOHTY 2005) IL-10 (BAKER et al. 1999; MIN et al. 2001; ANDERSEN et al. 2005; MOHTY 2005) IL-12 (ANDERSEN et al. 2005; MOHTY 2005), IL-17 (DANDER et al. 2009), IL-18 (MOHTY et al. 2005), TNFA (MIN et al. 2001; SCHOTS et al. 2003; ANDERSEN et al. 2005; MOHTY 2005) sTNFR1, IL-1Ra (ANDERSEN et al. 2005), INF γ e FASL (MOHTY et al. 2005).

As complicações mais graves pós-transplante alogênico, como a SOS, DECHa, síndrome do extravasamento capilar, foram associadas a níveis elevados de IL6, IL8 e TNF e também com mortalidade precoce nestes pacientes (MIN et al. 2001), assim como o aumento nos níveis de IL10, sTNFR1 e sTNFR2 também foram claramente associados com o desenvolvimento dos sintomas de DECHa (SCHOTS et al. 2003).

Dentre os trabalhos exclusivamente com transplantes autólogos, temos o de TEGG et al. (2001), que avaliou o valor prognóstico da dosagem da IL6 no dia do transplante, bem como sua relação com tempo de recuperação medular e período de hospitalização (TEGG et al. 2001), e o de SAUER et al. (2003), que comparou os

níveis de PCT com PCR como indicador de risco de morte por sepse em crianças pós-TMO (SAUER et al. 2003).

1.4.1 Interleucina 12

Interleucina 12 (IL12) (70 kDa) é um heterodímero composto pelas subunidades p40 e p35. É uma citocina fundamental para a iniciação e progressão da resposta imune tipo 1 (Th-1) (O’GARRA e MURPHY 2009), ou seja, resposta contra antígenos intracelulares que se caracteriza pela produção de IFNG. Tem como principal fonte as células dendríticas, macrófagos ativados (que são as primeiras a reconhecer um patógeno e as principais responsáveis pela produção de IL12) e linfócitos B (D’ANDREA 1992; CAR et al. 1999). A IL12 é produzida em resposta a produtos bacterianos, citocinas e outros estímulos liberados durante infecções e reações imunes mediadas por células, atua na resposta contra tumores, parasitas intracelulares, fungos, bactérias e vírus. É responsável por estimular a proliferação de células T e NK a partir das células progenitoras hematopoiéticas. É frequentemente a primeira citocina a ser liberada na presença do antígeno. A ativação de linfócitos T e células NK pela IL12 é acompanhada pela síntese e liberação de IFNG. É essencial para iniciar uma sequência de resposta envolvendo os macrófagos, as células NK e os linfócitos T, que resulta na erradicação de microorganismos intracelulares (CAR et al. 1999).

Altos níveis de IL12 circulantes estiveram correlacionados com desenvolvimento de mucosite grave em portadores de adenocarcinoma de pulmão submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil, cisplatina e leucovorin (SCHAUER et al. 2010). A IL12 também foi envolvida em lesões pulmonares resultantes de

endotoxemia. Em modelos animais de lesão pulmonar aguda induzida por endotoxemia e hemorragia alveolar, observou-se elevação da expressão de IL12 apenas no modelo de endotoxemia (ARNDT et al. 2000).

Num estudo com 117 neonatos, correlacionando o diagnóstico bacteriológico de sepse com dosagens de IL6, PCR, TNF, IL12, IL10, IL8, IL1B, PCT e contagem de células brancas, as dosagens de IL12 e IL10 foram as que apresentaram a maior especificidade no diagnóstico de sepse (SHERWIN et al. 2008). Em contrapartida, outro estudo não encontrou associação da mortalidade por sepse em pacientes internados na UTI com os níveis circulantes de IL12, nem destes com o escore APACHE (PRESTERL et al. 1997).

YOSHIMURA et al. (2002) não observaram elevação dos níveis circulantes de IL12 em portadores de linfoma submetidos a TCTH, mas esta interleucina estava elevada em portadores de câncer de pulmão também submetidos a TCTH, uma e três semanas após o transplante, e esteve correlacionada também, neste grupo, com aumento do número de células NK e linfócitos T citotóxicos (YOSHIMURA et al. 2002).

O único estudo que avaliou exclusivamente os níveis de IL12, em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, era formado por uma amostra mista de indivíduos submetidos a transplante autólogo e alogênico. Este estudo observou elevação dos níveis de IL12 em pacientes submetidos ao autólogo, mas não naqueles submetidos ao alogênico (BONNOTTE et al. 1996).

1.4.2 Interleucina 10

A IL10 (35–40kDa) é produzida, principalmente, por monócitos e macrófagos, mas também por linfócitos B, queratinócitos e outros tipos celulares. Seus efeitos biológicos resultam da capacidade de inibir muitas funções dos macrófagos ativados. Atua como inibidor da capacidade das células Th1 para sintetizar interferon, assim sendo, inibe a síntese de muitas outras citocinas, como IL1, IL2, TNFA, INFG, entre outras, especialmente a IL12. Também inibe a síntese de citocinas pelas células T e regula a proliferação e diferenciação das células B, mastócitos e timócitos (MOORE et al. 1993). Embora seus efeitos sejam predominantemente anti-inflamatórios, pode promover atividade citotóxica mediada por CD8 e alguma resposta das células B, por exemplo a secreção de IgA (IZCUE 2009).

Recentemente, um grupo de Ribeirão Preto – São Paulo, encontrou uma associação entre polimorfismos nos genes da IL10 e do TLR2, com a severidade e mortalidade associada à sepse em pacientes internados na UTI (CARREGARO et al. 2010).

HAUBER et al. (2002) avaliaram a expressão do RNA mensageiro das citocinas TNFA, IL10 e IL18 em células do lavado broncoalveolar de pacientes submetidos a transplante alogênico e com complicações pulmonares. Obsearam elevação da expressão de TNFA e IL10 e redução da expressão de IL18, contudo a expressão de IL10 só esteve aumentada nos paciente com pneumonia infecciosa e não naqueles com pneumonia idiopática/bronquiolite obliterante. Apenas a expressão de TNFA esteve associada com maior mortalidade (HAUBER et al. 2002).

Outro estudo demonstrou associação de baixos níveis circulantes de IL10 com maior probabilidade de desenvolvimento de mucosite GIII/IV associada à quimioterapia com cisplatina, 5-fluorouracil e leucovorin em portadores de adenocarcinoma de esôfago (SCHAUER et al. 2010).

Em uma amostra de pacientes submetidos a transplante autólogo ou alogênico, foi observado que altos níveis séricos de IL10 foram significativamente associados com evolução fatal. Uma vez que IL10 é um forte supressor da imunidade de células T, alta produção nas complicações graves pode levar a imunodeficiência funcional contribuindo para um pior prognóstico (HEMPEL et al. 1997).

Foi verificado que células mononucleares mobilizadas pré-transplante apresentaram níveis mais altos de RNAm para IL4, IL8, IL10, IFNG e TNFA. Especificamente, linfócitos T CD8⁺ expressaram níveis mais altos de RNAm para IL10 e IL8 do que linfócitos CD4⁺, e os monócitos expressaram níveis mais elevados de RNAm para IL10, IL8 e TNFA do que os observados em linfócitos CD8⁺ do produto de mobilização e do que monócitos de indivíduos normais (VARNEY et al. 1999). Entretanto, não há, por exemplo, demonstração da associação da produção de IL10 por células mononucleares de sangue periférico de pacientes submetidos a TCTH e a imunossupressão ou reconstituição imune pós-transplante (GUILLAUME et al. 1994).

Interessantemente, a IL10 que se eleva em pacientes expostos à quimioterapia em alta dose (LIEM et al. 1998) e está, normalmente, associada à inibição da resposta imune, parece ser necessária para produção de PTX3 por células dendríticas, mesmo após estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (DONI et al. 2006).

É conhecido que IL10 tem papel fundamental na prevenção de inflamação intestinal, mantendo o equilíbrio entre os microorganismos que compõem a flora e as defesas do hospedeiro. A microbiota balanceada promove a produção em níveis adequados da IL10 prevenindo contra colites. Defeitos nos genes IL10 desregulam a relação simbiótica entre microbiota e o hospedeiro através de alterações na resposta imune da mucosa intestinal, levando a quadros de inflamação. Camundongos deficientes de IL10 desenvolvem enterocolites espontâneas (SARAIVA e O’GARRA 2010).

Num estudo com camundongos deficientes para IL10 e submetidos à ligadura e perfuração cecal, que promove uma infecção polimicrobiana, apresentaram maior mortalidade, devido a menor atividade fagocitária, menor produção de NO e menor atividade antimicrobiana dos neutrófilos, apesar da atividade migratória destes estar preservada, em decorrência da diminuição da produção de IFNG (MORENO et al. 2006).

1.4.3 Interleucina 17

A IL17 (35 kDa) é uma citocina intimamente ligada ao tecido epitelial, particularmente à mucosa intestinal. É produzida por vários tipos de células, incluindo subpopulações de células T ativadas, células NK e neutrófilos. Desempenha um papel essencial na resposta imune contra bactérias e fungos. Sua ação pró-inflamatória é devido a sua capacidade de induzir a secreção de quimiocinas que recrutam monócitos e neutrófilos, facilita a ativação de células T e sua infiltração nos tecidos, regula a expressão de moléculas de adesão e amplifica a resposta imune induzindo a produção de IL6, prostaglandina E2, fator estimulante de

colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (BARNES e STALLARD 2001). Além disso, a IL17 atua sinergicamente com outras citocinas, especialmente IL1B, TNFA e IFNG (KOLLS e LINDÉN 2004). Células produtoras de IL17 têm sido recentemente implicadas na patogênese de uma vasta gama de doenças inflamatórias e auto-imunes (BARNES e STALLARD 2001).

Num modelo animal, onde a expressão de IL17A e IL17F pode ser regulada por estreptomicina, de enterocolite induzida pela inoculação de *S. typhimurium*, os níveis de IL17A e de IL17F não se correlacionaram com o grau de severidade da mucosite observada, ou o risco de disseminação sistêmica da infecção (SONGHET et al. 2010). Em outro estudo, observou-se que IL17 é necessária para promover a migração de neutrófilos para os sítios de infecção no modelo de infecção polimicrobiana (ligadura e perfuração cecal), além disso, esses animais desenvolveram mais infecção disseminada, apresentaram resposta inflamatória mais intensa e apresentaram maior mortalidade (FREITAS et al. 2009). Em modelos de infecção por *C. albicans*, a ausência de expressão do receptor de IL17A (IL17AR) promoveu menor migração de neutrófilos, maior número de fungos nos sítios de infecção e maior mortalidade (VAN DE VEERDONK et al. 2010).

1.4.4 sTLR2

TLR2 é um TLR que reconhece vários componentes de bactérias, micoplasmas, fungos e vírus através da formação de heterodímeros com TLR1 ou TLR6, e essas diferentes interações conferem capacidades distintas de reconhecimento de padrões moleculares (TAKEUCHI e AKIRA 2010).

LEBOUDER et al. (2003) demonstraram a existência natural de formas solúveis de TLR2, capazes de modular a ativação celular, que têm sua produção basal por monócitos do sangue, mas cuja produção aumenta após ativação celular. sTLR2 foi encontrado no sangue e no leite, e no leite foi observada uma correlação espelhada com os níveis de sCD14. Foi verificado também níveis mais baixos de sTLR2 em portadores de tuberculose, e a depleção deste ligante no soro aumentou a resposta celular à lipoproteína (LEBOUDER et al. 2003).

A deficiência de TLR2 em camundongos promove a formação de abscessos cerebrais por *S. aureus* dependente da produção local de IL17 por linfócitos Th17 (NICHOLS et al. 2009), a mesma coisa se observa em modelos de infecção pulmonar por inoculação intratraqueal com *P. brasiliensis* onde existe um desvio da resposta para um padrão Th17, com aumento do infiltrado neutrofílico e diminuição da carga fúngica, sem alteração na mortalidade dos animais (LOURES et al. 2009).

DULAY et al. (2009) avaliaram os níveis de sTLR2 no líquido amniótico de partos normais a termo, partos prematuros com e sem infecção. Viram que sTLR2 é expresso constitutivamente no líquido amniótico e que sua presença modula a intensidade da inflamação provocada por bactérias gram-positivas, o que é perdido com a depleção de sTLR2 no líquido amniótico (DULAY et al. 2009).

Células que superexpressam sTLR2, ou são estimuladas na presença desta proteína são hipossensíveis aos ligantes de TLR2. Soro depletado de sTLR2 deixou os leucócitos hipersensíveis à estimulação mediada por TLR2. Camundongos injetados com componentes derivados de bactérias gram-positivas e sTLR2 apresentaram menores níveis de KC, menor número de neutrófilos (PMN) e redução da apoptose tardia de PMNs no lavado peritoneal. Contudo, isto não interferiu com a

capacidade dos camundongos de clarear a infecção por gram-positivos (RABY et al. 2009).

1.4.5 Proteína C reativa (PCR)

É uma proteína plasmática produzida pelos hepatócitos em resposta à reação inflamatória, que pode ser motivada por diferentes tipos de agressão tecidual, como infecções, agressões físicas, químicas e imunológicas. Diante da reação inflamatória, os monócitos secretam IL6, IL1 e TNFA, que levam ao hepatócito a informação da necessidade de síntese das denominadas proteínas de fase aguda. A proteína C reativa é considerada uma das mais sensíveis proteínas de fase aguda, por apresentar algumas características, como meia-vida curta (entre 8 a 12 horas) e valores normais muito baixos ($<0,5\text{mg/dL}$), que, em resposta a estímulos inflamatórios, pode atingir valores até 100 vezes o normal em menos de 24 horas. Além de se elevar rapidamente após o estímulo inflamatório (4 a 6 horas), na ausência de estímulo crônico normaliza-se em 3 a 4 dias. Tem sua concentração elevada em diversos processos inflamatórios como infecções bacterianas crônicas e agudas, necroses celulares, tromboembolias pós-cirúrgicas, leucemias, colite ulcerativa, entre outras. Tem sido utilizada como auxiliar no diagnóstico, controle terapêutico e acompanhamento de diversas patologias, uma vez que é o mais sensível e precoce indicador de processos inflamatórios (ARBER et al. 2000; FLEISCHHACK et al. 2000; SAUER et al. 2003).

A PCR, bastante estudada como marcador diagnóstico e prognóstico para processo inflamatórios e infecciosos, em uma série de transplantados alogênicos, mostrou-se ser bastante útil na identificação de indivíduos de maior risco para

complicações graves e como preditor da gravidade destas alterações. A elevação dos níveis séricos da PCR ocorreu dias e até semanas antes do aparecimento das complicações, o que podemos considerar de interesse clínico para intervenções precoces (SAKATA et al. 2001). Níveis muito elevados de PCR também foram relacionados a infecções bacterianas invasivas (HEMPEL et al. 1997) e a desfecho fatal em pacientes com febre persistente no período de neutropenia pós-TMO (SORROR et al. 2005). O acompanhamento de seus níveis séricos pode ser útil tanto no diagnóstico quanto na discriminação entre sepse e sepse grave (ORTEGA et al. 2004).

É certo que o envolvimento desses múltiplos mediadores biológicos na patogênese de complicações em diversos órgãos e sistemas ainda precisa ser melhor investigado, para tanto nos propomos a estudar os níveis séricos de algumas proteínas pouco estudadas em transplantes autólogos (IL10, IL12, IL17), bem como propor outro elemento ainda não avaliado em TMO, como o sTLR2, e utilizar a PCR como um comparador.

Nossa proposta foi avaliar a associação destas com os eventos mais frequentes no pós-transplante autólogo, como mucosite e diarreia, que além de contribuírem para complicações maiores, por si só representam intenso desconforto e morbidade para o paciente e até hoje foram pouco pesquisadas especificamente nesta população, e, paralelamente, também com os demais eventos mais graves como sepse, insuficiência respiratória e outros que levam a necessidade de terapia intensiva, podendo prolongar a permanência intra-hospitalar do paciente e elevando os custos do procedimento. Não sabemos também se os resultados encontrados na nossa população serão similares àqueles observados em populações norte-americanas

e européias, haja visto a maior exposição da nossa população a patógenos ambientais, traduzida na maior mortalidade associada a causas infecciosas (World Health Organization-WHO 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar os níveis de IL10, IL12, IL17 e sTLR2 através de ELISA no soro de pacientes adultos submetidos à quimioterapia em alta dose com resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas pelo diagnóstico de mieloma múltiplo (MM), Linfoma de Hodgkin (LH) ou Não-Hodgkin (LNH).

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Correlacionar os níveis dos marcadores supracitados com a frequência de ocorrência de:
 - Sepses
 - Insuficiência respiratória aguda
 - Febre
 - Mucosite GII/III/IV
 - Diarréia
 - Ocorrência de complicações que demandem cuidados intensivos
2. Testar a associação de variáveis clínicas e de tratamento com a frequência das complicações estudadas.
3. Verificar a correlação entre si dos níveis das diversas citocinas.

- 4 Avaliar a correlação entre os níveis destas citocinas e o tempo de pega medular e o tempo de hospitalização.

3 JUSTIFICATIVA

Existe uma grande necessidade de se identificar grupos de risco para complicações infecciosas ou não pós-transplante, permitindo, desta maneira, tratar de forma precoce os indivíduos com potencial de complicação, o que resultaria na melhora dos resultados da quimioterapia em alta dose. Esperamos contribuir para identificação de tais indivíduos através da análise de um perfil de citocinas que eventualmente se correlacione com os desfechos anteriormente citados.

Atualmente, visando reduzir o tempo de internação na unidade de transplante, alguns serviços adotam a conduta de alta hospitalar precoce, ou seja, antes da pega medular. Este estudo pode contribuir para selecionar de forma mais precisa pacientes de baixo risco para complicações infecciosas ou não, capazes de seguir a terapia em regime de hospital-dia no pós-TCTH imediato.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Foram analisados todos os pacientes com idade superior ou igual a 16 anos, com diagnóstico de mieloma múltiplo ou linfoma, submetidos à quimioterapia de altas doses com resgate de células-tronco hematopoiéticas autólogas, na unidade de transplante de medula óssea do Hospital A.C. Camargo, no período de maio de 2010 a setembro de 2011. Um total de 60 pacientes foram incluídos no estudo após lerem e assinarem o termo de consentimento pós-informado (Anexos 3-4)

4.2 DEFINIÇÃO DOS EVENTOS

- **Sepse** - caracterizada por dois ou mais dos seguintes eventos, somados a presença de infecção: Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$, frequência cardíaca >90 bpm, frequência respiratória >20 rpm, leucócitos >12.000 células/mm³, <4.000 células/mm³, ou $>10\%$ de formas imaturas (ANONYMOUS 1992).
- **Insuficiência respiratória** – definida como a incapacidade do sistema respiratório em manter os valores da pressão arterial de oxigênio (PaO_2) e/ou da pressão arterial de gás carbônico (PaCO_2) dentro dos limites de normalidade ($\text{PaO}_2 > 60$ mmHg e $\text{PaCO}_2 < 50$ mmHg) ou $\text{satO}_2 < 90\%$ na oximetria de pulso (BERNARD et al. 1994).
- **Febre** - consideramos temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ em duas medidas isoladas

ou com duração de pelo menos 1h.

- **Mucosite GII/III/IV** – presença de dor importante em cavidade oral e/ou orofaringe que necessitasse de analgésico em infusão contínua (BEARMAN et al. 1988).
- **Diarréia** – consideramos presença de fezes líquidas ou semi-líquidas em volume igual ou maior que 500 ml/dia (BEARMAN et al. 1988).
- **Ocorrência de complicações que demandem cuidados intensivos:** qualquer evento que necessitasse transferência para UTI.
- **Tempo de pega medular:** consideramos o primeiro dia de 3 consecutivos com granulócitos $\geq 500/\text{mm}^3$ (HANSEN et al. 1998).
- **Tempo de hospitalização:** tempo decorrido entre o início do condicionamento e a alta.

Para a obtenção de dados sobre as comorbidades existentes pré-transplante que pudessem ter influência nos resultados foi utilizado o *Hematopoietic cell transplantation–specific comorbidity index* (HCT-CI), validado para pacientes com mieloma múltiplo submetidos a transplante autólogo (SORROR et al. 2005; LABONTE et al. 2008).

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletados 5,0 ml de sangue, em tubos Vacuntainer secos, na data de admissão do paciente na unidade de transplante, no dia da infusão das células-tronco, no dia da ocorrência do primeiro e segundo eventos, 24h e 72h após estes eventos e

na alta hospitalar. Na ausência de qualquer evento acima descrito foram apenas coletadas as amostras de admissão, infusão e alta.

Obtivemos ainda os resultados de hemograma e coagulação realizados nos dias das coletas das amostras.

As coletas de sangue foram realizadas por punção periférica, com método asséptico, ou através de cateter venoso central; neste caso a via do cateter foi lavada com 10 ml de água destilada, em seguida 5,0 ml de sangue foram aspirados e desprezados, e por fim foram aspirados os 5,0 ml destinados ao estudo. Na maior parte dos casos houve recusa do paciente pela punção venosa e, portanto, as amostras foram obtidas através do cateter venoso central.

As amostras foram coletadas em tubo seco e mantidas a 37°C, em banho-maria, por 30 minutos para coagulação, imediatamente foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. O soro então foi separado, aliquotado e armazenado a -80°C até o momento do uso. Vinte e quatro horas antes do uso foram descongeladas em refrigerador.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

A quantificação das citocinas e receptor solúvel foi realizada empregando-se o método de ELISA de captura, usando-se kits DuoSet da R&D Systems. As quantidades foram expressas em concentração por pg/ml.

4.4.1 Método ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) de captura

Foi realizado de acordo com as especificações do fabricante dos kits (R&D Systems), para tal utilizamos microplacas de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato, *half-area* (Greiner #675061 e Corning Costar #3590). Para cada proteína foi utilizado kit específico, conforme mostra Tabela abaixo, bem como as concentrações utilizadas para cada um.

Tabela 1 - Kits (R&D Systems) e as concentrações utilizadas dos anticorpos e proteínas.

Kit ELISA / Catálogo	Anticorpo de Captura (µg/ml)	Anticorpo de Detecção (ng/ml)	Curva Padrão Proteína* (pg/ml)
DuoSet human IL-10 (#DY217B)	2	150	2000
DuoSet human IL-12 p 70 (#DY1270)	4	100	2000
DuoSet human IL-17 (#DY317)	4	150	1000
DuoSet human TLR2 (#DY2616)	0.8	400	8000

*Concentração empregada para o ponto máximo da curva padrão

A Soluções Utilizadas:

1. Solução tamponada de fosfato PBS “*phosphate buffered saline*” - solução contendo 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,2 – 7.4.
2. Reagente Diluente – BSA1% em PBS, pH 7,2 – 7.4. (R&D Systems Catalog #DY995) .
3. Solução Substrato – 1:1 mistura de Color Reagente A (H₂O₂) e Color Reagente B (Tetramethylbenzidine). (R&D Systems Catalog #DY999).
4. Solução de Lavagem – 0.05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7.4. (R&D Systems Catalog #WA126) .
5. Solução de Parada - H₂SO₄ 2N. (R&D Systems Catalog #DY994) .

B Processo de lavagem das placas

Foi realizado em lavadora automática de placas (HydroSpeed, RChisto-Tecan). Realizada aspiração simultânea dos 96 poços, e injeção de 180µL de solução de lavagem por poço, permanecendo em agitação por 20 segundos, seguidos de nova aspiração. Cada etapa de lavagem foi composta de 5 ciclos de lavagem e aspiração. Este processo foi repetido após cada etapa do ensaio, exceto após a adição do substrato.

C Incubação

Todos os períodos de incubação necessários em cada etapa do ensaio foram realizados em incubadora com agitação orbital, sob condições de temperatura fixa a 25°C, sob agitação a 50rpm e protegidos da luz.

D Etapas do Ensaio

Etapa 1 - Sensibilização

As placas foram sensibilizadas com 50 µL/poço do anticorpo monoclonal primário, de captura, diluído em PBS conforme orientação do fabricante, permanecendo em incubação “*overnight*”.

Etapa 2 – Bloqueio

Foram distribuídos 150 µL/poço de solução de bloqueio (Reagente Diluente) para preenchimento dos espaços não ocupados nos poços, com o objetivo de evitar reações inespecíficas e, incubou-se por mais 2h.

Etapa 3 – Distribuição das amostras e curva padrão

Uma curva padrão foi construída com 7 pontos, através de diluições seriadas da proteína recombinante de interesse a partir da concentração máxima recomendada. As amostras de soro (50 μ L) foram distribuídas em duplicatas, sem diluição e foram incubadas *overnight*.

Dois poços foram destinados a caracterização do branco, recebendo apenas o Reagente Diluente.

Etapa 4 – Anticorpo secundário

O Ac secundário policlonal de detecção, conjugado a Biotina, diluído em Reagente Diluente foi então adicionado (50 μ L/poço) seguido por 2 horas de incubação.

Etapa 5 – Streptavidina

Streptavidina diluída em reagente diluente na concentração 1:200 foi distribuída 50 μ L/poço e incubada por 20 minutos.

Etapa 6 – Solução substrato

A reação foi revelada com a adição do substrato enzimático, 50 μ L/poço de Reagente A e B 1:1 v/v (R&D#DY999), seguida de 20 minutos de incubação.

Etapa 7 – Leitura

A solução de parada utilizada foi distribuída a 25 μ L/poço e imediatamente procedeu-se a leitura.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Infinite M200PRO, RChisto-Tecan) nos comprimentos de onda 450nm e 540nm. A fim de corrigir quaisquer imperfeições ópticas da placa os valores de densidade óptica (DO) encontrados na leitura de 540nm foram subtraídos da leitura feita em 450nm. Além disto, foi feita a subtração do branco e realizada média das duplicatas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados através de instrumento de coleta elaborado especialmente para este trabalho (Anexo 2).

Para as variáveis quantitativas foram apresentadas as principais medidas resumo, como média, desvio-padrão, valor mínimo e valor máximo e para as variáveis qualitativas foram apresentadas as respectivas distribuições de frequências absolutas e relativas.

Associações entre variáveis clínicas e a ocorrência dos eventos foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado. No caso de frequências esperadas inferiores a cinco foi realizada a correção de continuidade proposta por Yates (YATES 1934). A associação dos tempos de pega e hospitalização com a ocorrência dos eventos foi avaliada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para cada proteína, um modelo de análise de variância com medidas repetidas (PINHEIRO e BATES 2000a-c; NETER et al. 2005) foi utilizado para verificar a existência de variação da concentração de uma determinada proteína ao longo da internação. Esse modelo contempla a estrutura de dependência entre as observações de um mesmo paciente devido às avaliações realizadas ao longo da internação. Para

reduzir a variabilidade dos dados, cada modelo teve como variável resposta o logaritmo neperiano da concentração da proteína considerada. O momento da internação (admissão, infusão, 0h, 24h, 72h e alta) foi utilizado como variável explicativa, sendo a admissão a categoria basal.

O nível de significância adotado foi o de 5% e os softwares R versão 2.12 (www.r-project.org) e Microsoft Excel 2010 (www.microsoft.com) foram utilizados nas análises.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA

Foram incluídos 60 pacientes no estudo, o que constitui 100% da amostra proposta inicialmente, com uma média de idade de 50,6 anos, variando entre 16 e 72 anos, com 53% do sexo feminino (Tabela 2). Quanto aos diagnósticos, nossa casuística vem de encontro aos dados do *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR), publicados em 2010, quanto às principais indicações do transplante autólogo: Mieloma Múltiplo, seguido por Linfoma não-Hodgkin e Linfoma Hodgkin. A maior parte dos pacientes encontrava-se em resposta completa e o transplante foi utilizado como terapia de consolidação (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes quanto às características demográficas e patológicas.

Característica	Categoria	N	(%)
Gênero	Masculino	28	47
	Feminino	32	53
Raça	Branca	45	75
	Negra	6	10
	Parda	9	15
Diagnóstico	Mieloma Múltiplo	29	48
	Linfoma de Hodgkin	13	22
	Linfoma não-Hodgkin	18	30
Indicação	Doença refratária	14	23
	Doença recaída	21	35
	Consolidação de 1a. linha	25	42
Resposta pré-TMO	RC	31	52
	VGPR	10	17
	PR	15	25
	DE	1	2
	PD	3	5

*RC: resposta completa, VGPR: *very good partial response*, PR: resposta parcial, DE:doença estável, PD: progressão de doença.

A maior parte dos indivíduos com diagnóstico de linfoma apresentava doença avançada ao diagnóstico, e 23% apresentavam doença *bulky*. O grupo dos mielomas também apresentava estadiamento mais avançado ao diagnóstico, conforme mostra a Tabela 4, quase 70% dos pacientes com ECIII (Durie-Salmon) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes quanto a dados do estadiamento dos linfomas ao diagnóstico

DIAGNÓSTICO				
ANN_ARBOR	Linfoma de Hodgkin	Linfoma não-Hodgkin	N	(%)
II	3	2	5	17
III	5	4	9	30
IV	5	12	17	53
SINTOMAS_B				
SIM	5	6	11	37
NÃO	8	12	20	63
BULKY				
SIM	3	4	7	23
NÃO	10	14	24	77

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes quanto ao estadiamento do mieloma múltiplo.

Estádio	N	(%)
DS		
IIA	6	20
IIIA	15	52
IIIB	4	14
ND*	4	14
ISS	N	(%)
1	10	35
2	4	14
3	7	24
ND*	8	27
Total	29	100

* ND: Não disponível, DS: Durie-Salmon, ISS: *International Staging System*

Analisando o tratamento prévio ao transplante, considerando os diferentes grupos diagnósticos (Tabela 5), observamos que todos os pacientes com diagnóstico de linfoma, tinham feito tratamento quimioterápico e que, com exceção de três paciente, todos os demais haviam recebido duas ou mais linhas de quimioterapia.

Além disto, sete dos 31, haviam sido também tratados em algum momento com radioterapia. Dentre os mielomas, apenas dois pacientes receberam esquemas quimioterápicos como terapia de indução: VAD (Vincristina, Doxorubicina e Dexametasona) e CCNU/CTX/MEL/DEXA (Lomustina, Ciclofosfamida, Melfalano e Dexametasona) e uma paciente já havia realizado um transplante autólogo, utilizando melfalano 200mg/m². Os demais receberam esquemas com talidomida ou bortezomibe associados à dexametasona, ou ainda mais recentemente, associado à ciclofosfamida. Todos os pacientes do grupo mieloma receberam ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (GCSF) para mobilização das células-tronco hematopoiéticas. Dentre os linfomas, apenas uma paciente recebeu este esquema, os demais foram mobilizados com associação do GCSF ao esquema quimioterápico de indução.

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes quanto ao tratamento prévio ao transplante.

Diagnóstico				
	Mieloma	Linfoma de Hodgkin	Linfoma não-Hodgkin	Total
QUIMIOTERAPIA				
SIM	3	13	18	34
NÃO	26	0	0	26
N_ESQUEMAS				
1	16	1	2	19
2	9	9	6	24
3	3	1	7	11
Mais de 3	1	2	3	6
RADIOTERAPIA				
SIM	6	4	3	13
NÃO	23	9	15	47
Total	29	13	18	60

*Inclui todos os esquemas terapêuticos utilizados para redução da doença ou consolidação de resposta, realizados antes da internação na unidade de transplante.

Como observamos nas Tabelas 6, 7 e 8, a maior parte dos pacientes não apresentavam comorbidades e mantinham um bom performance status antes do transplante. Dos 21 que apresentavam comorbidade, alguns tinham duas ou mais associadas. Dentre as comorbidades agrupadas como “outras” tivemos hepatite B, obesidade, osteoporose, ICC (insuficiência cardíaca congestiva), IAM (infarto agudo do miocárdio), ICo (insuficiência coronariana), uma paciente com história de câncer de reto tratado com cirurgia em 1997 e outra com história de aspergilose prévia.

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes quanto às comorbidades.

Comorbidade	DIAGNÓSTICO			Total
	Mieloma Múltiplo	Linfoma de Hodgkin	Linfoma não-Hodgkin	
Nenhuma	15	12	12	39
DM	3	0	1	4
HAS	10	0	1	11
DPOC	1	0	1	2
IRC	1	0	0	1
Hipotireoidismo	2	1	1	4
Outras	5	1	4	10
Total	29	13	18	71

*DM: diabetes mellitus, HAS: hipertensão arterial sistêmica, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica, IRC: insuficiência renal crônica.

Tabela 7 – Distribuição dos pacientes quanto ao escore HCT -CI.

HCT-CI	DIAGNÓSTICO			Total
	Mieloma Múltiplo	Linfoma Hodgkin	Linfoma não-Hodgkin	
0	25	13	14	52
1	2	0	0	2
2	0	0	2	2
3	2	0	2	4
Total	29	13	18	60

*HCT-CI - Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes quanto ao Performance status.

ECOG	DIAGNÓSTICO			Total
	Mieloma Múltiplo	Linfoma Hodgkin	Linfoma não-Hodgkin	
0	17	7	14	38
1	12	5	4	21
2	0	1	0	1
Total	29	13	18	60

5.2 DADOS RELEVANTES SOBRE O TRANSPLANTE

O condicionamento utilizado para todos os transplantes dos pacientes com Mieloma Múltiplo foi melfalano 200mg/m², sendo feito com ajuste de dose para 140mg/m² em 3 deles, devido à disfunção renal. Para os pacientes com linfoma não-Hodgkin predominou, conforme nos mostra a Tabela 9, o esquema BEAM (Carmustina, Etoposide, Citarabina e Melfalano), já os linfomas de Hodgkin receberam igualmente o esquema BEAM ou CBV (Carmustina, Etoposide e Ciclofosfamida). Dos 60 transplantados, 6 necessitaram de terapia intensiva e as causas foram: insuficiência respiratória, sepse e bacteremia. Com relação ao uso de nutrição parenteral, um terço dos pacientes fez uso, sendo a principal indicação a presença de mucosite, impossibilitando a ingesta adequada. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos diagnósticos, sugerindo um grau semelhante de dano à mucosa com o uso destes esquemas terapêuticos. A instituição de antibioticoterapia foi necessária em quase 100% dos pacientes, seja por neutropenia febril, sinusopatia ou diarreia. Vinte e cinco por cento do total da amostra necessitou de terapia antifúngica.

Tabela 9 - Principais informações sobre o transplante. Inclui esquemas quimioterápicos, necessidade de terapia intensiva, suporte nutricional parenteral e uso de antimicrobianos.

	DIAGNÓSTICO			Total
	Mieloma Múltiplo	Linfoma de Hodgkin	Linfoma não- Hodgkin	
CONDICIONAMENTO				
BEAM	0	6	13	19
CBV	0	5	0	5
MEL200	26	0	0	26
MEL140	3	0	0	3
OUTROS	0	1	5	6
UTI				
SIM	1	2	3	6
NÃO	28	11	15	54
NPP				
SIM	6	8	6	20
NÃO	23	5	12	40
Antibiótico				
SIM	28	13	18	59
NÃO	1	0	0	1
Antifungico				
SIM	3	4	8	15
NÃO	26	9	10	45
Total	29	13	18	60

*BU/CTX/VP16 -bussulfano/ciclofosfamida/etoposídeo, LACE - lomustina/citarabina/ciclofosfamida/etoposídeo e BU/MEL – bussulfano e melfalano

Todos os pacientes submetidos ao transplante receberam profilaxia infecciosa com antiviral (valaciclovir ou aciclovir), antifúngico (fluconazol) e antibiótico (sulfametoxazol-trimetoprim). Verificamos que 55 pacientes apresentaram febre e 25 agentes etiológicos foram identificados, dentre os quais 10 bactérias gram-positivas. As infecções e os microorganismos relacionados estão listados na Tabela 10. A antibioticoterapia empírica foi necessária na quase totalidade dos pacientes, com exceção de um e foi introduzida na vigência de temperatura axilar maior ou igual a

37,5° C, ou na presença de outros sinais infecciosos.

Tabela 10 - Infecções e agentes identificados

Tipo	Número
Corrente sanguínea	11
Tiflíte	5
Sinusite	4
Pneumonia	3
Endocardite	1
Agentes Infecciosos	
<i>S. epidermidis</i>	8
<i>K. Pneumoniae</i>	3
<i>S. galactus</i>	1
<i>S. hominis</i>	1
<i>S. maltophilia</i>	1
<i>E. coli</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	1
<i>R. radiobacter</i>	1
<i>Fusarium</i>	1
<i>Cândida parapsilosis</i>	1
<i>Clostridium difficile</i>	4
<i>Citomegalovirus</i>	2

O tempo de pega medular (Tabela 11) foi em média de 9 dias, variando entre 7 - 13 dias, e conforme verificamos não houve diferença entre os 3 diagnósticos. Já o período de hospitalização foi em média 23 dias (14-58) e foi menor nos casos de mieloma, isto devido, provavelmente, ao menor tempo do condicionamento utilizado para estes pacientes.

Tabela 11 - Tempo de pega medular e tempo de hospitalização

	Diagnóstico	Média	Desvio	Mínimo	Mediana	Máximo	N
			padrão				
Tempo de pega*	Mieloma Múltiplo	10,03	1,27	7	10	14	29
	Linfoma de Hodgkin	9,38	0,87	8	9	11	13
	Linfoma não-Hodgkin	9,56	0,92	8	9,5	11	18
Tempo de Hospitalização*	Mieloma Múltiplo	20,52	6,32	14	19	43	29
	Linfoma de Hodgkin	23,50	8,31	17	20,5	48	13
	Linfoma não-Hodgkin	25,44	4,34	20	25,5	35	18

*Tempo em dias

5.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E SUA RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DOS EVENTOS

Os 60 pacientes submetidos a quimioterapia de altas doses, apresentaram 132 eventos de interesse do estudo. Destes eventos, 98 tiveram amostras coletadas para análises das proteínas, sendo 55 eventos de febre, 31 de diarreia e 13 de mucosite.

Três dos pacientes estudados não apresentaram nenhum evento de interesse, foram, portanto coletadas amostras de sangue apenas nos momentos da admissão, infusão e alta; 5 apresentaram apenas um, 23 tiveram os 2 eventos coletados para o estudo e alguns ainda, apresentaram além destes, outros eventos, mas que não foram incluídos no estudo por estarem previstas apenas coletas de 2 eventos por paciente. Estes eventos, no entanto, foram considerados e incluídos nas análises de correlação com as variáveis clínicas.

Ao analisarmos as associações feitas entre as principais variáveis clínicas com a frequência de ocorrência de febre e mucosite, observamos que estes não estiveram associados com nenhuma destas variáveis (Tabela 12 e 14). Diarreia esteve associada com o diagnóstico de mieloma múltiplo e com a realização prévia de

radioterapia (Tabela 13). Sepses esteve associada ao uso de antifúngicos (Tabela 15). O tempo para pega e o tempo de hospitalização não estiveram associados ao desenvolvimento de febre, diarreia ou mucosite (Tabelas 16 e 17).

Tabela 12 - Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de febre.

Variável	Categoria	Febre		Total	P
		Não n (%)	Sim n (%)		
Sexo	F	2 (3,4)	27 (46,5)	29	1,0
	M	1 (1,7)	28 (48,3)	29	
Diagnóstico	LH	1 (1,7)	12 (20,7)	13	0,864
	LNH	1 (1,7)	17 (29,3)	18	
	MM	1 (1,7)	26 (44,8)	27	
Indicação	Refratários	1 (1,7)	13 (22,4)	14	0,399
	Recaídos	0 (0)	21 (36,2)	21	
	Consolidação 1ª.linha	2 (3,4)	21 (36,2)	23	
Quimioterapia	Não	0 (0)	19 (32,8)	19	0,544
	Sim	3 (5,1)	36 (62,0)	39	
Radioterapia	Não	2 (3,4)	44 (75,9)	46	0,508
	Sim	1 (1,7)	11 (19,0)	12	
HCT-CI	Não	3 (5,1)	49 (84,5)	52	0,947
	Sim	0 (0)	6 (10,2)	6	
Antifúngico	Não	3 (5,1)	40 (69,0)	45	0,561
	Sim	0 (0)	15 (25,9)	15	

Tabela 13 – Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de diarreia.

Variável	Categoria	Diarréia		Total	P
		Não n (%)	Sim n (%)		
Sexo	F	6 (10,3)	22 (37,9)	28	1,0
	M	7 (12,1)	23 (41,4)	30	
Diagnóstico	LH	7 (12,1)	6 (10,3)	13	0,008
	LNH	3 (5,1)	15 (25,9)	18	
	MM	3 (5,1)	24 (41,4)	29	
Indicação	Refratários	5 (8,6)	9 (15,5)	14	0,112
	Recaídos	6 (10,3)	15 (25,9)	21	
	Consolidação 1ª linha	2 (3,4)	21 (36,2)	25	
Quimioterapia	Não	2 (3,4)	17 (29,3)	19	0,117
	Sim	11 (19,0)	28 (48,3)	39	
Radioterapia	Não	13 (22,4)	33 (56,9)	47	0,051
	Sim	0 (0)	12 (20,7)	13	
HCT-CI	Não	12 (20,7)	40 (69,0)	54	1,0
	Sim	1 (1,7)	5 (8,6)	6	
Antifúngico	Não	9 (15,5)	34 (58,6)	45	0,724
	Sim	4 (6,8)	11 (19,0)	15	

Tabela 14 - Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de mucosite.

Variável	Categoria	Mucosite		Total	P
		Não n (%)	Sim n (%)		
Sexo	F	17 (29,3)	11 (19,0)	28	0,421
	M	20 (34,5)	10 (17,2)	32	
Diagnóstico	LH	5 (8,6)	8 (13,8)	13	0,588
	LNH	8 (13,8)	10 (17,2)	18	
	MM	8 (13,8)	19 (32,8)	27	
Indicação	Refratários	7 (12,1)	7 (12,1)	14	0,427
	Recaídos	15 (25,9)	6 (10,3)	21	
	Consolidação 1ª linha	15 (25,9)	8 (13,8)	23	
Quimioterapia	Não	14 (24,1)	5 (8,6)	19	0,212
	Sim	23 (39,7)	16 (27,6)	39	
Radioterapia	Não	28 (48,3)	18 (31,0)	46	0,506
	Sim	9 (15,5)	3 (5,1)	12	
HCT-CI	Não	5 (8,6)	1 (1,7)	6	0,402
	Sim	32 (55,2)	20 (34,5)	52	
Antifúngico	Não	27 (46,6)	16 (27,6)	43	1,0
	Sim	10 (17,2)	5 (8,6)	15	

Tabela 15 - Relação entre as variáveis clínicas e a ocorrência de sepse.

Variável	Categoria	Sepse		Total	P
		Não n (%)	Sim n (%)		
Sexo	F	25 (43,1)	3 (5,1)	28	1,0
	M	27 (46,6)	3 (5,1)	30	
Diagnóstico	LH	12 (20,7)	1 (1,7)	13	0,938
	LNH	16 (27,6)	2 (3,4)	18	
	MM	24 (41,4)	3 (5,1)	27	
Indicação	Refratários	12 (20,7)	2 (3,4)	14	0,853
	Recaídos	19 (32,6)	2 (3,4)	21	
	Consolidação 1ª linha	21 (36,2)	2 (3,4)	23	
Quimioterapia	Não	17 (29,3)	2 (3,4)	19	1,0
	Sim	35 (60,3)	4 (6,8)	39	
Radioterapia	Não	42 (72,4)	4 (6,8)	47	0,362
	Sim	10 (17,2)	2 (3,4)	12	
HCT-CI	Não	48 (82,8)	4 (6,8)	52	0,112
	Sim	4 (6,8)	2 (3,4)	6	
Antifúngico	Não	41 (70,7)	2 (3,4)	45	0,034
	Sim	11 (19,0)	4 (6,8)	15	

Tabela 16 - Relação entre a ocorrência dos eventos e o tempo de pega medular.

Evento	Categoria	n	média	desvio padrão	Mínimo	mediana	máximo	
Febre	Não	6	9.5	1.0	8	9.5	11	0,5752
	Sim	54	10.9	8.4	7	10	71	
Diarréia	Não	29	11.9	11.4	8	10	71	0,65
	Sim	31	9.7	1.2	7	10	13	
Mucosite	Não	47	11.0	9.0	7	10	71	0,947
	Sim	13	9.9	1.5	8	10	14	

Tabela 17 - Relação entre a ocorrência dos eventos e o tempo de hospitalização.

Evento	categoria	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo	
Febre	Não	6	22.2	9.4	14	20	40	0,2607
	Sim	54	24.9	9.3	14	22	73	
Diarréia	Não	29	22.9	6.6	14	21	48	0,2887
	Sim	31	26.2	11.2	14	23	73	
Mucosite	Não	47	24.4	10.0	14	22	73	0,2143
	Sim	13	25.3	6.2	18	23	40	

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS PROTEÍNAS SÉRICAS

As amostras sanguíneas dos 60 pacientes foram coletadas nos momentos de admissão na unidade de transplante, imediatamente antes do início do tratamento, sem que houvesse sido iniciado uso de antimicrobianos profiláticos, quimioterápicos ou mesmo soroterapia, para evitar qualquer interferência e distorção dos resultados (3 pacientes já estavam em uso de antibióticos no momento da internação). As amostras referentes à infusão, foram coletadas antes da infusão endovenosa das células hematopoiéticas, para avaliar o grau de inflamação desencadeado até aquele momento, ou seja, refletir o dano induzido pelo condicionamento. As amostras dos eventos foram coletadas nos momentos 0h, 24h e 72h aproximadamente, alguns pacientes apresentaram mais de um evento simultaneamente, sendo então colhida apenas uma amostra para análise dos 2 eventos. As amostras de alta foram coletadas no dia da alta hospitalar.

Vinte e oito amostras foram perdidas, seja por falta de coleta no momento de interesse, ou por identificação inadequada. Três pacientes não tiveram as amostras de alta coletadas pois evoluíram à óbito.

As análises dos soros foram feitas através do método ELISA de captura e as concentrações das proteínas foram expressas em pg/ml. Na maioria dos casos, independente do instante avaliado, as concentrações de IL12 e IL17 foram indetectáveis. Já IL10 e sTLR2 apresentaram mais amostras consideradas positivas.

Não obtivemos êxito em dosar a proteína C-reativa, que havia sido proposta como um parâmetro de comparação com as demais proteínas do estudo. O kit comercial escolhido (Human C-Reactive Protein DuoSet DY1707 da R&D

SYSTEM) apresentava alta sensibilidade, detectando níveis entre 15,62 pg/ml e 1000 pg/ml de PCR. Tentamos inicialmente a realização do teste utilizando as amostras de soro puras, porém todas as amostras ultrapassaram o valor máximo de detecção do teste, posteriormente repetimos o experimento com uma diluição 1:100, a qual também se mostrou insuficiente. Observamos que nossas amostras de soro apresentavam concentrações muito elevadas de PCR para uso deste kit, optamos portanto por excluir a dosagem desta proteína do estudo, uma vez que não dispúnhamos de tempo para importação de outro teste.

5.4.1 Interleucina 12

No momento da admissão todos os indivíduos apresentaram concentrações de IL12 indetectáveis. Dois pacientes apresentaram concentrações diferentes de zero (VCT 45,738 e AAZ 127,56 pg), na infusão e na alta respectivamente. Analisando as amostras coletadas nos momentos dos eventos, observamos 5 pacientes com níveis detectáveis de IL12 (VCT 62,213, FAP 47,359, JODS e WJL com o mesmo valor 59,195 e AMM1 103,82). Sendo que VCT e FAP apresentavam simultaneamente febre e diarreia nos momentos de coleta; JODS e WJL compartilharam o mesmo valor (59,195) durante a febre e AMM1 apresentava mucosite.

5.4.2 Interleucina 17

Interleucina 17 foi detectada em apenas um paciente no momento da sua admissão para o transplante (AAZ 74,838). Na infusão, foi detectada em outros 3 indivíduos (FFJ 137,41, COL 71,731 e FAL 102,93). E na alta em 7 (AMM2 54,914, COL 33,858, EMB 22,821, FAL 81,343, ICGB 125,51, IGC 43,26, LCPM 20,03).

Durante a febre, 2 pacientes apresentaram todas as amostras com níveis detectáveis de IL17 (COL 19,821, 53,218, 51,945) e (FAL 120,21, 64,989, 45,994), sendo que este último apresentava diarreia simultaneamente. Outros 2 tiveram uma única amostra detectável na febre (EMB 21,673 e MTCB 25,221). Quando analisamos o evento diarreia, vemos que além do paciente FAL, outros dois apresentaram 2 amostras positivas (COL 108,74, 15,671) e (IGC 58,731, 55,355) e um terceiro apresentou uma amostra isolada (EMB 21,673) na hora zero da diarreia. Durante a ocorrência de mucosite, outros pacientes (MTCB 25,221, 41,949) e (AMM1 41,916) tiveram elevação de IL17.

5.4.3 Interleucina 10

Interleucina 10 foi mais frequentemente detectada nas amostras da população estudada que as citocinas anteriormente citadas. Cinco pacientes já apresentavam níveis elevados de IL10 na admissão para o transplante. Imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, 8 amostras apresentavam elevação de IL10. Durante a febre, 28% dos pacientes apresentaram níveis elevados de IL10, durante a ocorrência de diarreia 35.4% dos indivíduos e durante mucosite, em 38,5% das amostras foram detectados valores mais elevados de IL10.

Um indivíduo apresentou todas as amostras positivas (WJL – admissão 313,46, infusão 150,94, febre 53,779/ 50,649/ 43,298, diarreia 88,151/ 89,882/ 46,845 e alta 147,73); outros dois deram início ao tratamento com índices indetectáveis de IL10, porém após o condicionamento apresentaram elevação e assim se mantiveram até a alta (MACA 44,911/ 50,772/ 261,19/ 128,42/ 212,86/ 205,26/ 110,03) e (NFS 141,67/ 129,36/ 101,5/ 62,804/ 77,521/ 151,22/ 133,33). E ainda

outro paciente, VCT, teve sete de nove amostras com IL10 detectável (285,78/ 183,16/ 150,14/ 144,03/ 137,75/ 189,45/ 175,41).

Ao analisarmos os valores obtidos durante os eventos, notamos que a concentração de IL10 parece não variar ao longo do tempo quando consideramos a febre ($p=0,125$), diarreia ($p=0,43$) e mucosite ($p=0,128$), conforme observamos nas Figuras 1 a 3.

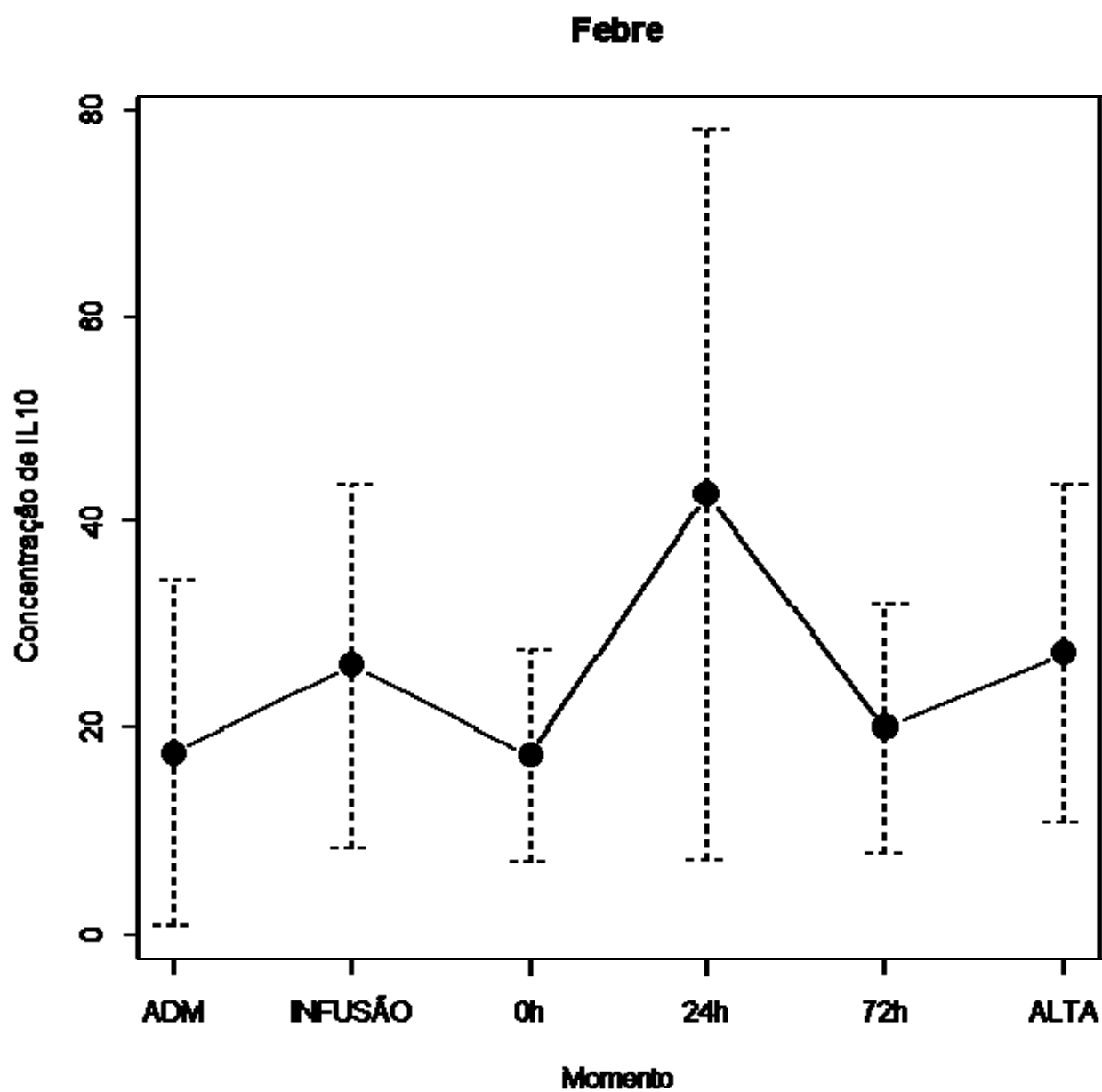


Figura 2 - Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta. As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da febre e na alta hospitalar.

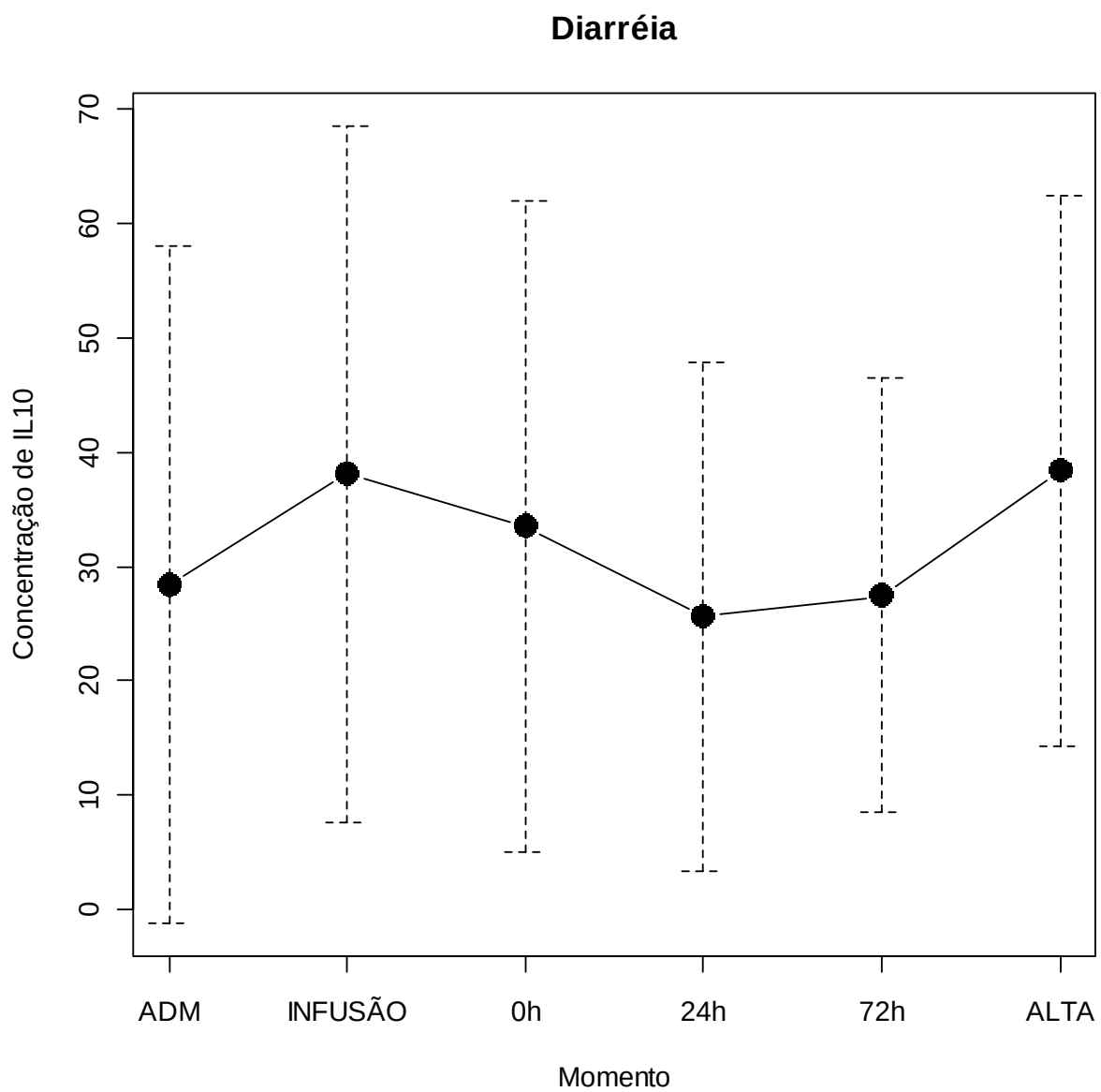


Figura 3 - Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta. As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da diarréia e na alta hospitalar.

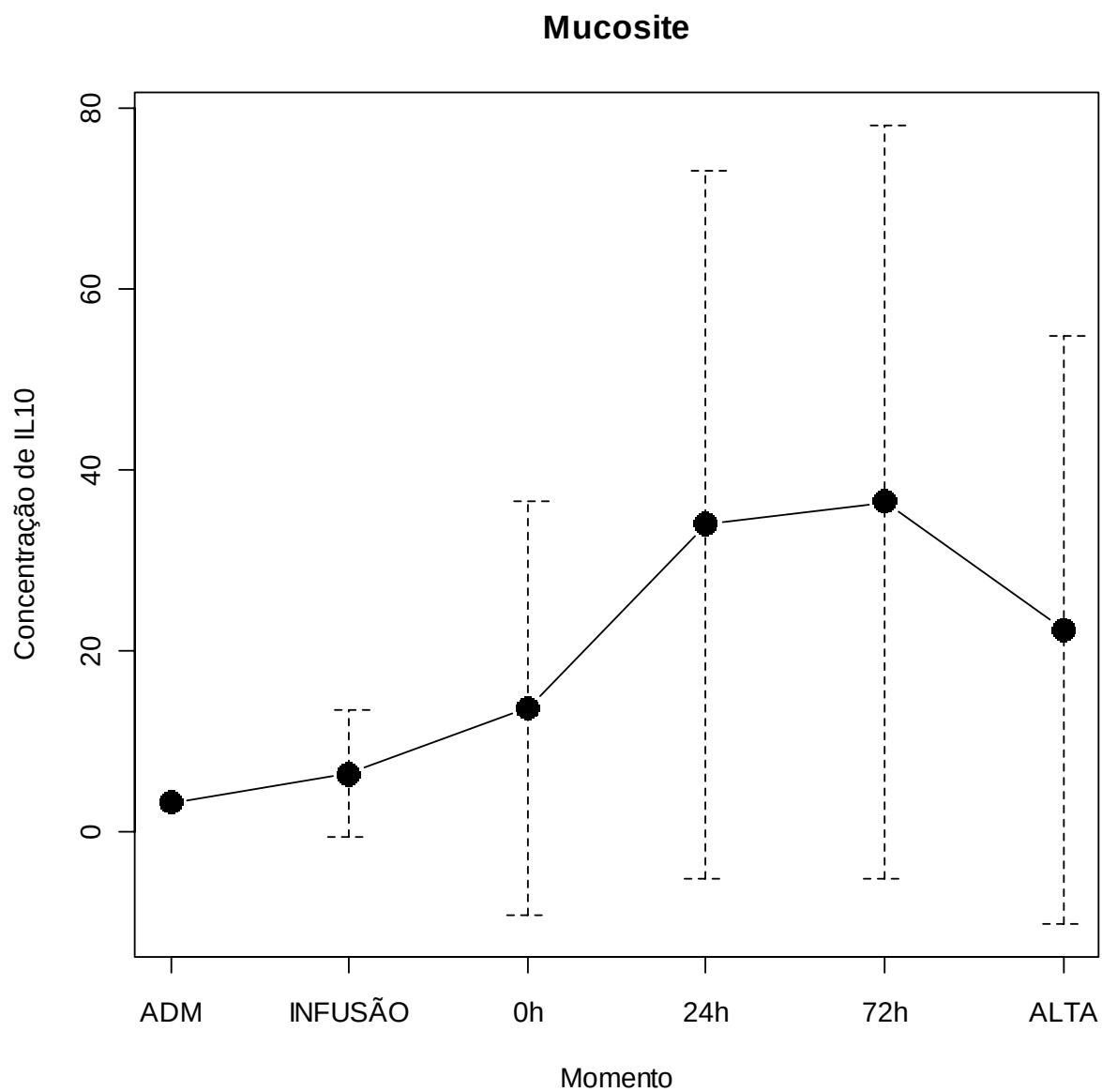


Figura 4 - Variação da concentração de IL10 em função dos momentos de coleta. As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da mucosite e na alta hospitalar.

Podemos também observar que não há maior expressão de IL10 logo após o término do condicionamento (amostras referentes à infusão), nem tão pouco apresenta uma correlação entre os diferentes momentos dos eventos (0h, 24h e 72h) o que poderia ser esperado. Na Tabela 18, observamos os valores mínimos e máximos, bem como média, mediana e desvio padrão, e suas variações no transcorrer do transplante e na presença dos diferentes eventos.

Tabela 18 - Concentração de IL10 na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início dos eventos e na alta hospitalar.

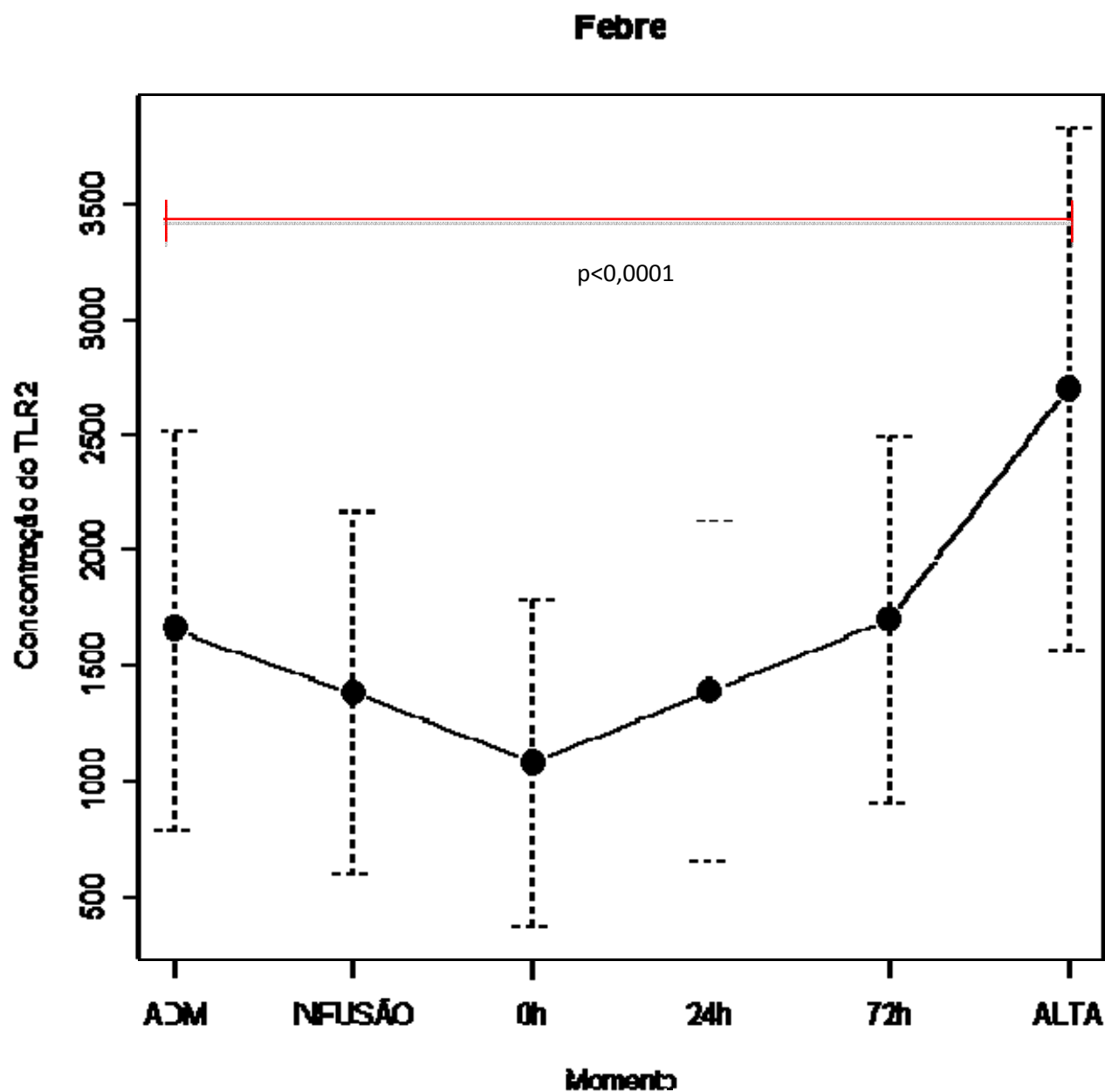
Evento	Momento	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo	NA
Febre	ADM	51	17.5	59.6	3.1	3.1	313.5	3
	INFUSÃO	51	26.1	62.9	3.1	3.1	329.9	3
	0h	52	17.3	36.9	3.1	3.1	171.0	2
	24h	53	42.7	128.9	3.1	3.1	880.8	1
	72h	52	20.0	43.3	3.1	3.1	225.6	2
	ALTA	42	27.3	52.9	3.1	3.1	196.5	12
Diarréia	ADM	29	28.4	77.9	3.1	3.1	313.5	2
	INFUSÃO	28	38.1	78.4	3.1	3.1	329.9	3
	0h	28	33.5	73.2	3.1	3.1	329.9	3
	24h	29	25.6	58.6	3.1	3.1	284.6	2
	72h	29	27.4	49.8	3.1	3.1	175.4	2
	ALTA	27	38.4	60.8	3.1	3.1	196.5	4
Mucosite	ADM	12	3.1	0.0	3.1	3.1	3.1	1
	INFUSÃO	13	6.3	11.6	3.1	3.1	44.9	0
	0h	12	13.6	36.2	3.1	3.1	128.4	1
	24h	13	33.9	64.7	3.1	3.1	212.9	0
	72h	11	36.4	62.1	3.1	3.1	205.3	2
	ALTA	8	22.2	39.0	3.1	3.1	110.0	5

*ADM: admissão. NA: não se aplica (amostras perdidas).

5.4.4 sTLR2

Do total de pacientes transplantados, 24 (40%) já apresentavam níveis detectáveis de sTLR2 no momento da admissão na unidade de transplante, 22 (36.7%) amostras pré-infusão de células-tronco e 27 (45%) das amostras no momento da alta hospitalar apresentaram detecção de sTLR2. Quando analisamos as amostras de soros referentes aos eventos, temos que na ocorrência de febre 30 (55.5%) destas amostras apresentavam elevação de sTLR2, 19 (61%) na diarreia e 10 (77%) na vigência de mucosite (Tabela 19).

O paciente ICGB iniciou o tratamento e infundiu as células-tronco com níveis indetectáveis de sTLR2, porém durante os dois eventos (febre e diarreia) apresentou índices elevados em todas as amostras, se mantendo assim até a alta. Sete pacientes apresentaram todas as amostras elevadas. Quatro apresentaram todas as amostras com níveis acima do valor máximo da curva padrão. Para um deles, com exceção da admissão, todas as demais amostras apresentavam altos valores de sTLR2. Seis outros com exceção de uma das amostras, as demais todas apresentavam altos valores.



*A concentração de sTLR2 variou significativamente ao longo do tempo ($p<0,0001$).

Figura 5 - Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta. As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da febre e na alta hospitalar.

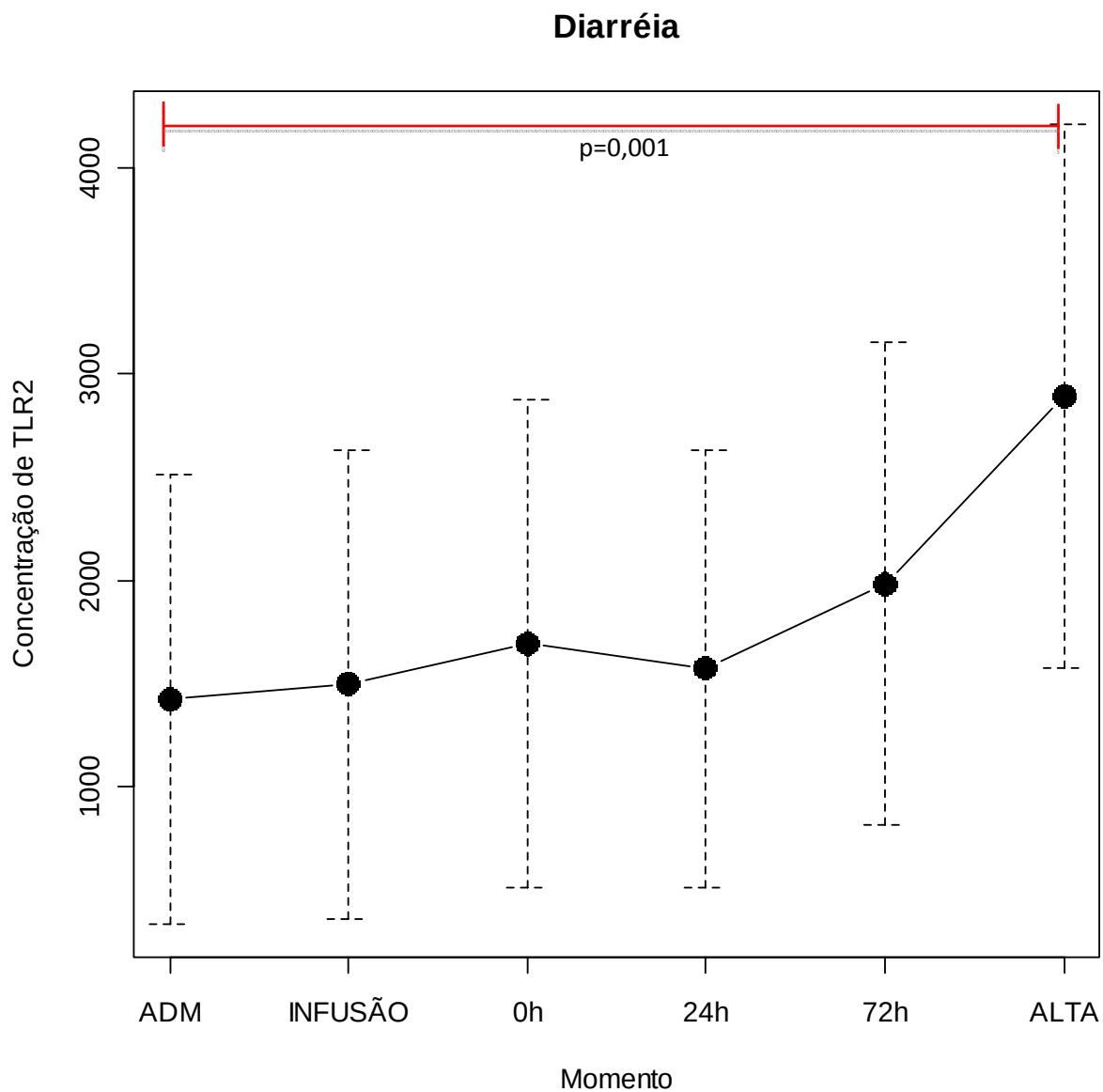


Figura 6 - Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta. As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da diarréia e na alta hospitalar. A concentração de sTLR2 variou significativamente ao longo do tempo quando consideramos os eventos febre ($p=0,001$).

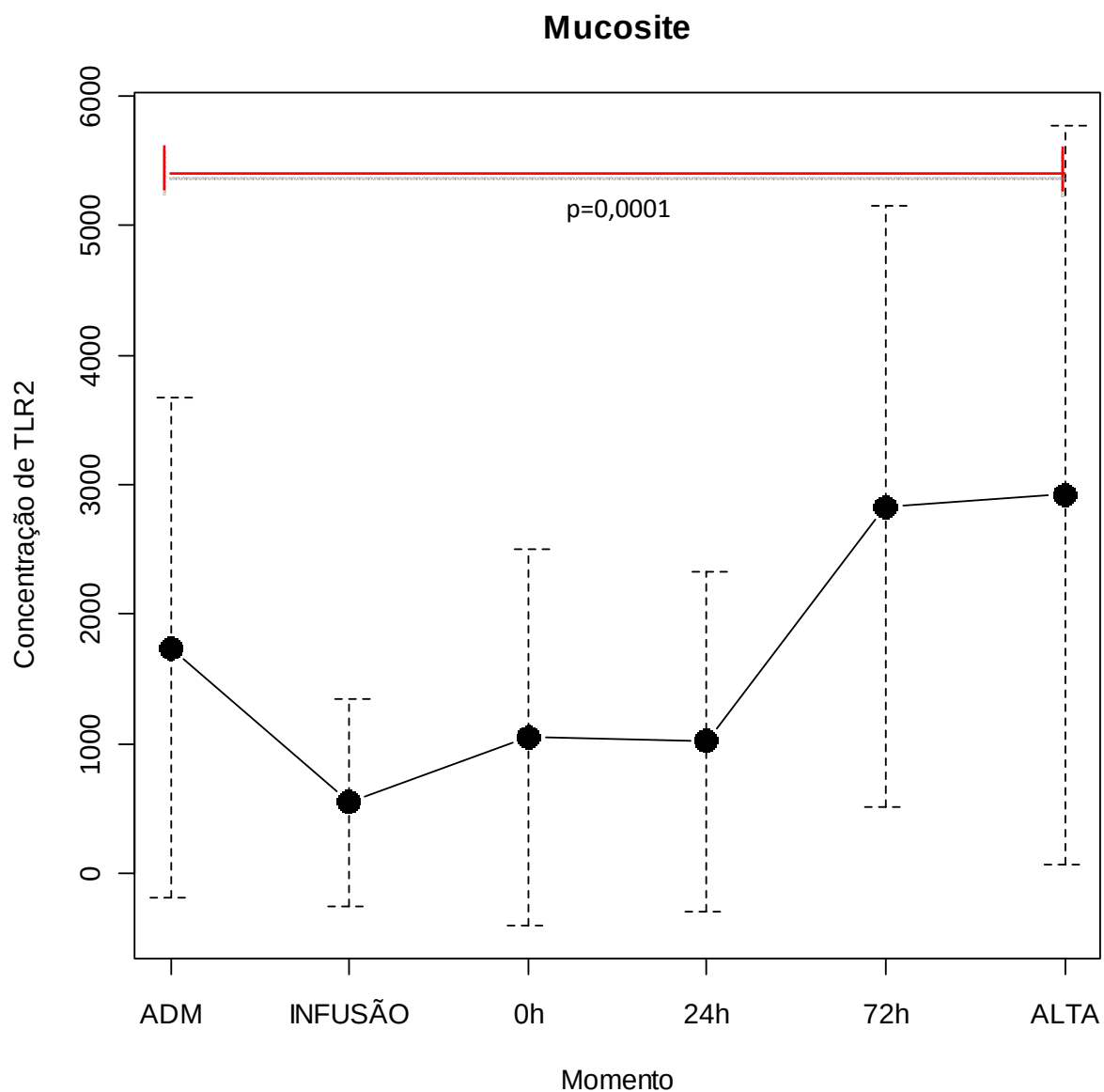


Figura 7 - Variação da concentração de sTLR2 em função dos momentos de coleta.

As amostras foram colhidas na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início da mucosite e na alta hospitalar. A concentração de sTLR2 variou significativamente ao longo do tempo ($p < 0,0001$)

Tabela 19 - Concentração de sTLR2 na admissão, imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, nos momentos 0h, 24h e 72h do início dos eventos e na alta hospitalar.

Evento	Momento	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	NA
Febre	ADM	45	1656.0	2892.0	6.3	131.1	8000	9
	INFUSÃO	45	1381.1	2608.9	6.3	6.3	8000	9
	0h	52	1079.7	2551.9	6.3	6.3	8000	2
	24h	53	1389.2	2664.1	6.3	6.3	8000	1
	72h	52	1699.8	2863.0	6.3	231.0	8000	2
	ALTA	36	2700.9	3342.2	6.3	680.9	8000	18
Diarréia	ADM	28	1420.7	2811.0	6.3	6.3	8000	3
	INFUSÃO	27	1494.5	2875.6	6.3	6.3	8000	4
	0h	28	1694.7	3052.7	6.3	6.3	8000	3
	24h	29	1572.4	2783.2	6.3	6.3	8000	2
	72h	28	1981.1	3018.9	6.3	251.9	8000	3
	ALTA	26	2894.2	3263.8	6.3	1211.6	8000	5
Mucosite	ADM	12	1735.8	3036.4	6.3	99.7	8000	1
	INFUSÃO	13	543.6	1316.9	6.3	6.3	4811	0
	0h	12	1047.1	2289.7	6.3	6.3	8000	1
	24h	13	1016.1	2172.4	6.3	367.9	8000	0
	72h	11	2830.4	3452.9	6.3	727.1	8000	2
	ALTA	8	2923.6	3411.6	6.3	1213.0	8000	5

*ADM: admissão. NA: não se aplica (amostras perdidas).

A concentração de sTLR2 parece variar ao longo do tempo quando consideramos os eventos febre ($p < 0,0001$), diarréia ($p = 0,001$) e mucosite ($p < 0,0001$), sendo estatisticamente significativa apenas a diferença de concentração entre alta e a admissão (Figuras 4, 5 e 6).

Nenhum fator clínico mostrou-se associado à variação da concentração de sTLR2 na alta e a na admissão, como podemos observar na Tabela 20.

Tabela 20 - Variação da concentração de sTLR2 na admissão e na alta segundo as variáveis clínicas.

Momento	Variável								
	Gênero	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	NA	
Admissão	F	26	1938.7	3179.9	6.25	6.25	8000	2	0.8674
	M	25	1285.9	2610.5	6.25	6.25	8000	7	
Alta	F	19	3480.0	3605.9	6.25	1777.2	8000	9	
	M	22	1712.1	2679.0	6.25	506.59	8000	10	
Diagnóstico									
Admissão	LH	11	2334.0	3656.1	6.25	6.25	8000	2	0.6265
	LNH	14	1624.9	2816.4	6.25	242.0	8000	4	
	MM	26	1312.7	2660.3	6.25	6.25	8000	3	
Alta	LH	7	3898.9	3824.4	6.25	2598	8000	6	
	LNH	13	2225.6	3338.5	6.25	551.9	8000	5	
	MM	21	2264.9	2994.3	6.25	549.4	8000	8	
Indicação									
Admissão	1	12	1886.8	2968.7	6.25	667.6	8000	2	0.4842
	2	16	2808.4	3696.9	6.25	242.0	8000	5	
	3	23	651.2	1843.8	6.25	6.25	8000	2	
Alta	1	7	2870.0	3554.8	6.25	1366.1	8000	7	
	2	13	4067.1	3729.1	6.25	2598.0	8000	8	
	3	21	1467.8	2436.3	6.25	6.3	8000	4	
Quimioterapia									
Admissão	Não	21	811.1	1984.2	6.25	6.25	8000	1	0.2491
	Sim	30	2184.0	3320.6	6.25	242.015	8000	8	
Alta	Não	17	1863.3	2805.1	6.25	294.8	8000	5	
	Sim	24	3004.6	3475.1	6.25	983.635	8000	14	
Radioterapia									
Admissão	Não	39	1437.7	2717.1	6.25	6.25	8000	8	0.6384
	Sim	12	2207.0	3513.9	6.25	186.12	8000	1	
Alta	Não	29	2534.1	3216.6	6.25	551.94	8000	18	
	Sim	12	2524.9	3396.7	6.25	801.97	8000	1	
Antifungico									
Admissão	Não	39	1633.0	2906.6	6.25	6.25	8000	6	0.2739
	Sim	12	1572.1	3025.8	6.25	172.5	8000	3	
Alta	Não	33	2147.4	3026.9	6.25	544.0	8000	12	
	Sim	8	4115.3	3750.9	6.25	3985.3	8000	7	
HCT CI									
Admissão	0 ou 1	45	1610.3	2910.2	6.25	6.25	8000	9	0.7704
	2 ou 3	6	1681.6	3134.2	6.25	276.4	8000	0	
Alta	0 ou 1	35	2468.9	3148.5	6.25	549.4	8000	19	
	2 ou 3	6	2895.7	3966.1	6.25	680.9	8000	0	

O tempo de pega não se correlacionou com a variação da concentração de sTLR2 ($p=0.46$)

TLR2 na alta - TLR2 na admissão vs Tempo de Pega

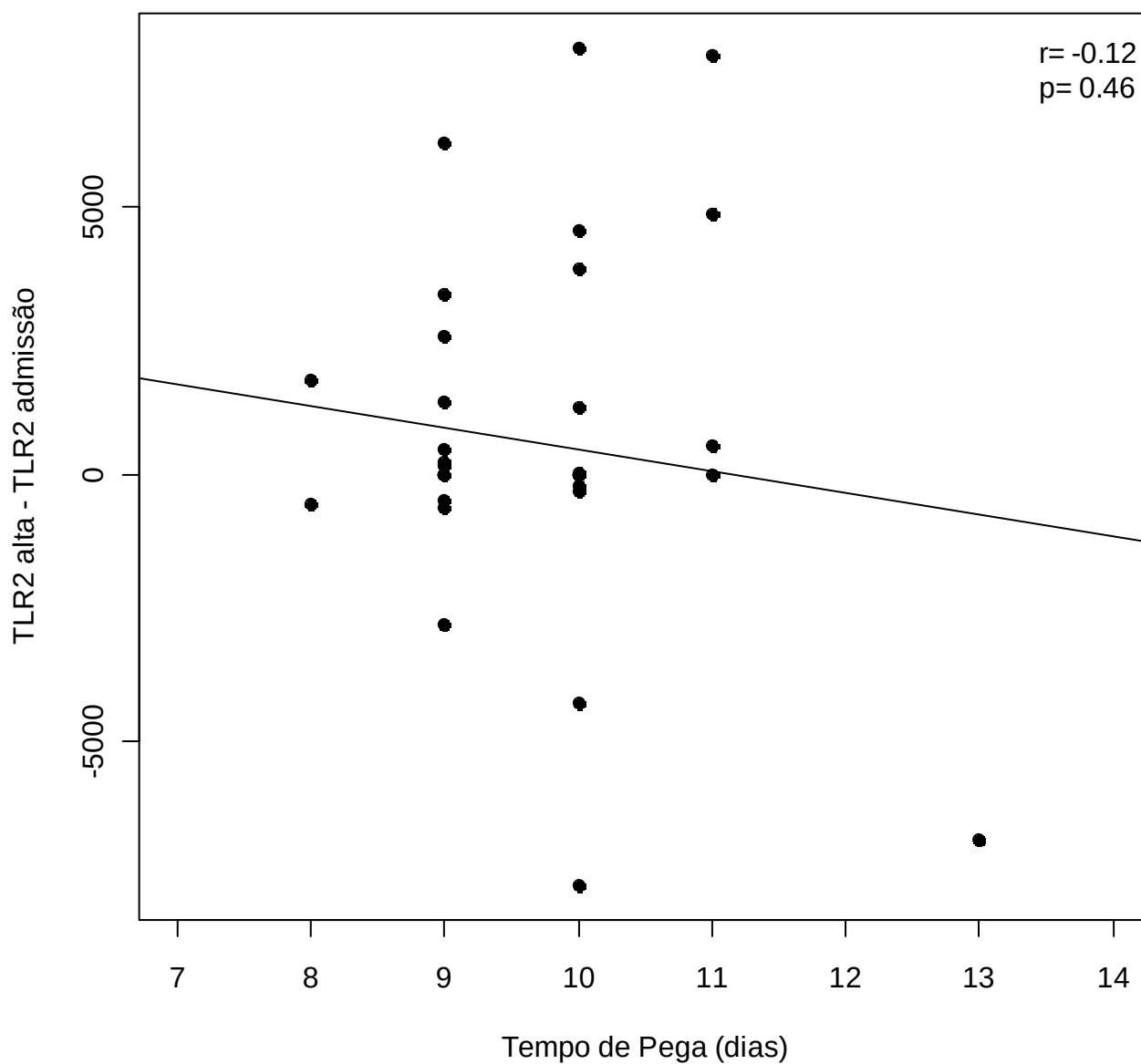


Figura 8 - Correlação entre a variação da concentração de sTLR2 entre a admissão e a alta e o tempo de pega medular (teste de Spearman).

O tempo de hospitalização correlacionou-se fracamente com a variação da concentração de sTLR2 ($p=0.03$). Parece que quanto maior o tempo de hospitalização maior a variação da concentração de sTLR2.

TLR2 na alta - TLR2 na admissão vs Tempo de Hospitalização

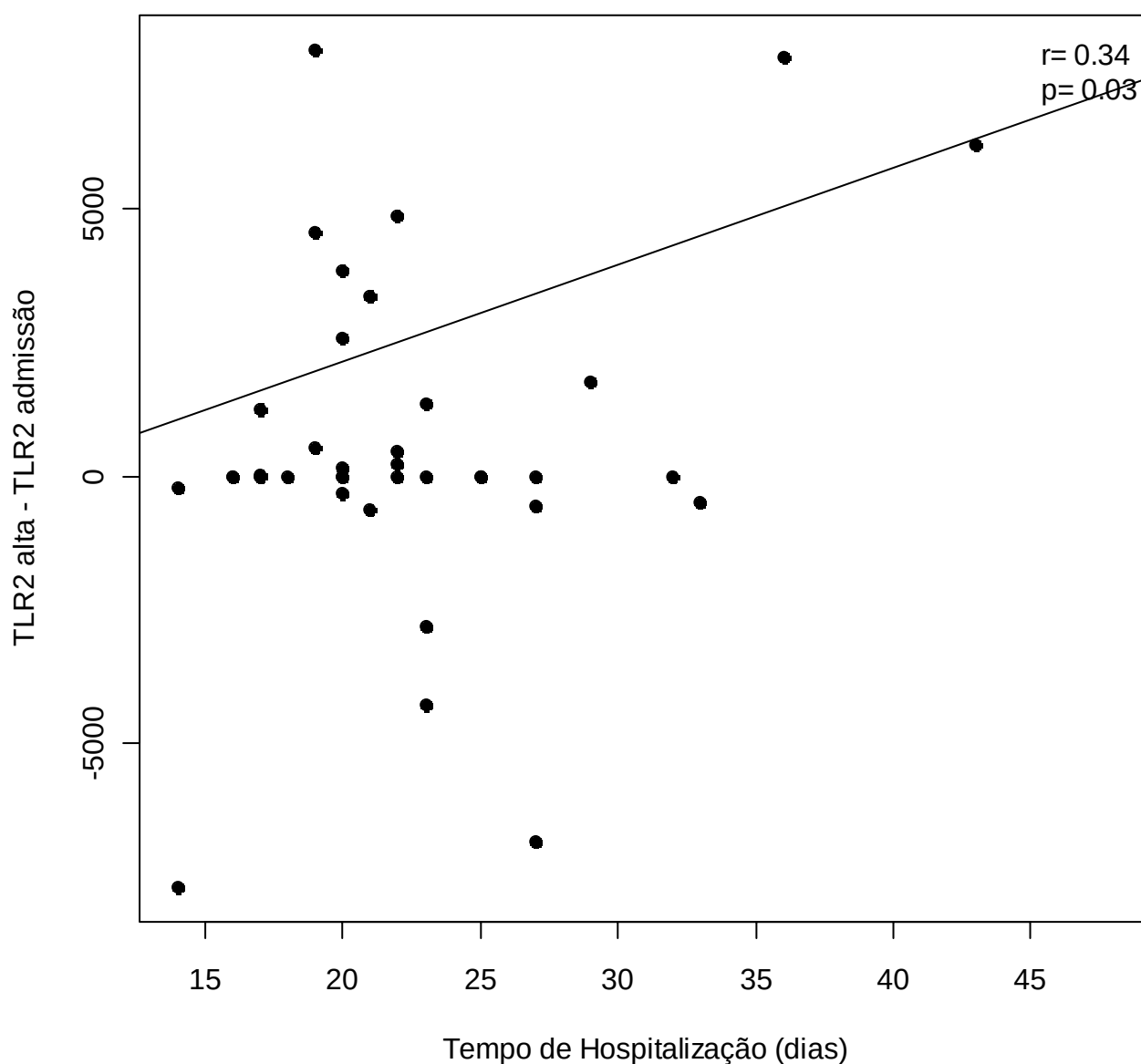


Figura 9 - Correlação entre o tempo de hospitalização e a variação da concentração de sTLR2 entre a admissão e a alta (teste de Spearman).

6 DISCUSSÃO

Apesar da quimioterapia em altas doses com infusão de células progenitoras hematopoiéticas estar sendo cada vez mais indicada e realizada em todo o mundo ao longo das últimas décadas (PASQUINI e WANG 2011), ainda nos dias de hoje o manejo da toxicidade inerente a este regime quimioterápico intensivo é desafiador. O interesse em estudar novas medidas para reduzir a agressividade do regime de condicionamento sobre os tecidos e de desenvolver novas estratégias para redução da incidência e gravidade das principais complicações é crescente, objetivando reduzir a morbimortalidade, reduzir o tempo de hospitalização, bem como custos hospitalares. Neste sentido nos propomos a estudar o processo inflamatório envolvido nas complicações mais freqüentes, buscando desvendar o envolvimento de algumas proteínas que possam ser atuantes neste contexto. Além de traçar as características demográficas e clínicas dos pacientes que se submetem a este tratamento, e buscar a relação destas com as complicações, tentando desenhar perfis de riscos. Desenvolvemos, portanto este estudo prospectivo, onde analisamos uma população submetida a quimioterapia em altas doses com resgate de células progenitoras hematopoiéticas para o tratamento das doenças: mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin. No total incluímos 60 pacientes, em um período de 16 meses.

A maior parte dos pacientes estudados encontrava-se em resposta completa (52%) e o transplante foi utilizado como terapia de consolidação (42%), a principal indicação deste tratamento (CUTLER e ANTIN 2005), distribuídos quase que

igualmente entre ambos os sexos (32/28).

Metade da amostra foi composta por pacientes com mieloma múltiplo, o que provavelmente contribuiu para uma média de idade um pouco mais elevada (51 anos), que é compatível com a epidemiologia desta doença.

Com relação às características clínicas, a população estudada apresentava, de uma maneira geral, condições favoráveis à tolerância do tratamento com altas doses de quimioterapia, como bom performance status, 39 em 60 não tinham comorbidades, e 52 em 60 tiveram HCT_CI zero. O tempo de pega medular observado em nossa casuística foi em média 9 dias, e de internação 23 dias, o que vem de encontro ao descrito na literatura (PASQUINI e WANG 2011). Apenas 6 (10%) pacientes demandaram cuidados intensivos, e 3 (5%) evoluíram ao óbito, índices também compatíveis com dados publicados (BARNES e STALLARD 2001; PASQUINI e WANG 2011). As causas dos óbitos foram insuficiência respiratória e falência de múltiplos órgãos.

O perfil infeccioso da população estudada vem de encontro ao descrito na literatura entre pacientes neutropênicos, com predomínio de bactérias gram-positivas (FREIFELD et al. 2011), sendo a maior parte dos episódios febris considerados de origem indeterminada. Dois pacientes apresentaram reativação de citomegalovirus no transcorrer do transplante e dois outros apresentavam hepatite B ativa no momento da admissão na unidade de transplante e iniciaram terapia antiviral antes do início do condicionamento.

Encontramos uma associação do uso de antifúngicos com a ocorrência de sepse ($p=0,034$). Este dado pode indicar que os pacientes que tiveram a terapia antifúngica instituída, encontravam-se em situação de maior gravidade, com

potencial maior de desenvolver sepse, já que a terapia com antifúngicos nesta população era iniciada, de forma empírica, quando sinais e sintomas clínicos sugestivos de infecção fúngica surgiam, ou na presença de febre prolongada na vigência de antibioticoterapia de largo espectro, ou seja denotando infecção de difícil controle. Também é conhecido o fato que as infecções fúngicas em transplantados de medula representam alta morbidade e mortalidade (NUCCI 2007).

Inicialmente havíamos considerado a necessidade de UTI como um evento de interesse do estudo, porém nenhuma amostra sanguínea foi coletada destes indivíduos no momento desta ocorrência, assim como dos 4 pacientes que desenvolveram sepse e dos 4 que manifestaram insuficiência respiratória, por terem estas complicações, ocorrido posteriormente a coleta de dois primeiros eventos. Talvez o fato da limitação do número de eventos para coleta de amostras estar restrita aos dois primeiros, tenha prejudicado o estudo destas complicações, que ocorreram mais tardiamente durante o transcorrer do transplante. Portanto dos eventos propostos para o estudo, realizamos análises das proteínas apenas de casos de mucosite, febre e diarreia, os eventos mais incidentes nesta casuística e os primeiros cronologicamente. Foram incluídos 55 eventos de febre, 31 de diarreia e 13 de mucosite.

Observamos associação estatisticamente significativa em relação ao diagnóstico de mieloma múltiplo e a ocorrência de diarreia ($p=0,008$). Provavelmente este fato se deve a utilização do melfalano em dose mais elevada nos pacientes com mieloma, quando comparada com a dose desta droga no esquema de condicionamento BEAM, utilizado para a maior parte dos pacientes com linfoma. É conhecido que a toxicidade do melfalano à mucosa do trato gastrointestinal é

considerada de moderada à grave e é dose dependente (SAMUELS e BITRAN 1995).

Outro achado foi a associação de radioterapia prévia e a ocorrência de diarreia. Observamos uma maior ocorrência de diarreia entre os pacientes previamente expostos a esta modalidade de tratamento ($p=0,051$), sugerindo que a radioterapia tenha o potencial de promover a sensibilização dos tecidos, agravando o processo inflamatório desencadeado pelo condicionamento (HILL 2009). O mesmo não observamos com relação a mucosite, seja por que nesta população o campo irradiado na maioria dos casos não envolveu cabeça e pescoço, ou assim como STROBEL et al. (2007), que analisaram frequência, gravidade e fatores de risco para mucosite, em uma série de 50 pacientes com LNH e LH submetidos a TMO, utilizando BEAM como regime de condicionamento, concluíram que o risco de mucosite maior que G2 em pacientes previamente tratados com e sem radioterapia foi 39% x 46% ($p= 0,89$; OR 0.7; 95%CI 0.2 – 2.7), respectivamente; resultados de significância comprometida provavelmente pelo número limitado de pacientes incluídos no estudo (STROBEL et al. 2007). Interessantemente, também não observamos correlação entre mucosite e os diagnósticos, embora haja na literatura uma gama de estudos mostrando a contribuição dos diferentes esquemas quimioterápicos utilizados no tratamento destas doenças, na incidência de mucosite. É sabido que alguns agentes estão mais associados a danos a mucosa como a citarabina e o etoposídeo em alta dose, e que os agentes que são ciclo-específico, são mais tóxicos para mucosa do que aqueles ciclo-celular não-específicos. Além disso, a maior parte das drogas citotóxicas alcançam a membrana mucosa através do sangue, mas algumas como o etoposídeo, podem ser encontradas na saliva, tendo um efeito

direto sobre o epitélio, resultando em maior grau de dano (NISCOLA et al. 2007).

A ocorrência de mucosite, que ainda possui uma incidência bastante elevada de 75 a 100% entre os transplantados (WARDLEY et al. 2000), apesar do advento da laserterapia, que contribuiu substancialmente para redução da incidência e gravidade da mucosite, ainda representa um papel importante na morbidade dos pacientes e no aumento dos custos do tratamento. Sabemos que alguns fatores de risco são inerentes ao indivíduo como os extremos de idade, más condições de higiene e saúde bucal, variações genéticas na resposta farmacodinâmica, desnutrição, elevados níveis de creatinina que parecem aumentar a toxicidade à mucosa, o fumo, diminuição de produção salivar; e outros inerentes ao tratamento, como o tipo de agente quimioterápico utilizado, irradiação prévia, e os cuidados bucais empregados durante o tratamento.

A ocorrência de mucosite em nossa amostra, não se correlacionou com o tempo de pega medular, conforme também já havia sido descrito por MCCANN et al. (2009), que publicaram resultados de um estudo observacional, multicêntrico europeu, que incluiu 197 pacientes com mieloma múltiplo ou linfoma não-Hodgkin submetidos a tratamento com altas doses de melfalano ou BEAM, respectivamente, também não encontrou relação entre a incidência ou gravidade da mucosite e o tempo de pega medular. A pega medular, no entanto, foi positivamente correlacionada com a duração da mucosite grave (Coeficiente de correlação de Spearman 0,27; $p=0,012$) (MCCANN et al. 2009). A mucosite também não mostrou relação com o tempo de hospitalização em nossa casuística, onde incluímos mucosite G2-4, já o estudo de MCCANN et al. (2009) , mostrou que a mucosite grave (considerada G3 e 4) prolongou a hospitalização em 2,3 dias ($p=0,013$) em pacientes

com MM, mas não nos pacientes com LNH (estes últimos já tendiam a uma internação mais longa) (MCCANN et al. 2009).

Também não encontramos nenhuma relação entre o tempo de pega com a ocorrência de febre ou diarreia. Embora fosse esperado que o tempo prolongado de neutropenia contribuisse para maior incidência de febre. Assim como o tempo de hospitalização parece também não ter sido influenciado pela ocorrência destes eventos em nosso estudo.

Analisando as concentrações séricas das proteínas estudadas, observamos que com relação a IL12, apenas 5 pacientes tiveram níveis elevados desta proteína em nossa amostra de transplantados. Os valores variaram de 45.738pg/ml a 127.56pg/ml, portanto não pudemos fazer qualquer associação com os eventos ou com as diferentes etapas do transplante. Esses resultados são similares aos de BONNOTTE et al. (1996), que analisaram concentrações séricas de IL12 em uma coorte de pacientes submetidos a transplante autólogo e alogênico e encontraram resultados similares a de doadores saudáveis (183pg/ml) e também não conseguiu associar o desenvolvimento de infecção com a indução de IL12 (BONNOTTE et al. 1996).

Esperávamos ainda verificar associação do aumento de IL12 com infecções virais incidentes em TMO como infecções por herpes simplex, citomegalovirus, e outros que pudessem se apresentar durante o transplante, uma vez que o papel de IL12 na resposta viral já foi demonstrado por NOVELLI e CASANOVA (2004). Em nossa casuística, 2 pacientes apresentaram infecções virais, porém os níveis de IL12 nestes casos se mostraram abaixo do nível de detecção. Com relação a resposta à infecções por outros agentes etiológicos, MARRIOTT (2004) estudaram camundongos deficiente para IL-12 e/ou IL-23 (citocina pertencente a mesma

família) e mostraram um aumento na suscetibilidade à infecções bacterianas, parasitárias e fúngicas. Foi demonstrado inclusive a capacidade de IL12 de atuar na eliminação de bactérias intracelulares como foi observado por MARRIOTT (2004), que verificou a habilidade de osteoblastos infectados por *S aureus* de elaborar IL12, aumentando a resposta imune de células T auxiliares, o que parece ser um avanço no entendimento da eliminação de bactérias intracelulares (MARRIOTT 2004). Nós, entretanto não pudemos relacionar qualquer evento infeccioso com o aumento de IL12.

Com relação a IL17, ao incluirmos esta proteína no estudo, tínhamos a intenção de verificar qual seu papel nos processos inflamatórios nesta amostra de pacientes, que apresenta como principal característica um período prolongado de neutropenia grave. E ainda de investigar a participação da IL17 na febre, mucosite e diarreia, mas especialmente na insuficiência respiratória desencadeada pela “síndrome da pega” uma das complicações pós recuperação medular, caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar. Existem evidências experimentais e clínicas sobre o envolvimento da IL17A e possivelmente IL17F, como um promotor da granulopoiese, acúmulo e ativação de neutrófilos no pulmão, articulações, sistema nervoso central e tecido intestinal. Considerada fundamental na defesa e autoimunidade, a IL17 com sua ampla e específica distribuição de receptores, está envolvida em uma vasta gama de doenças inflamatórias (KOLLS e LINDÉN 2004). No intestino, é considerada a guardiã da barreira mucosa, atuando através do recrutamento de neutrófilos e monócitos para os tecidos e da indução da produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais. Animais deficientes em IL17 se mostraram extremamente susceptíveis à infecções por bactérias e fungos

(HIROTA et al. 2012). Nossos resultados, porém, não nos permitiram fazer nenhuma associação com os eventos febre, mucosite ou diarreia, bem como não podemos afirmar que seus níveis tenham se alterado significativamente no transcorrer do transplante. Tampouco pudemos associá-la a síndrome da pega, já que não obtivemos nenhuma amostra em casos de insuficiência respiratória.

É sabido que IL10 é uma citocina antiinflamatória, um potente supressor de macrófagos e células T, e atua no controle dos processos infecciosos, impedindo respostas inflamatórias exacerbadas. Da nossa casuística, cinco pacientes já apresentavam níveis elevados de IL10 na admissão para o transplante, porém destes, três não mantiveram esses níveis, refletindo provavelmente alguma condição inflamatória existentes antes do início do transplante. Cinco indivíduos apresentaram elevação de IL10 imediatamente antes da infusão das células hematopoiéticas, ou seja, amostras que provavelmente traduzem o grau de inflamação desencadeado pelo esquema de condicionamento. Sendo que dois destes mantiveram altos níveis até a alta. LIEM et al. (1998) ao analisar uma coorte de pacientes submetidos a transplante alogênico, já haviam observado que IL 10 se eleva em pacientes expostos à quimioterapia em alta dose (LIEM et al. 1998). Já ANDERSEN et al. (2005), analisando um rol de citocinas em uma coorte de transplantados alogênicos utilizando condicionamentos com TBI/VP16, TBI/CY, BU/CY associados ou não a uso de ATG, não verificaram nenhuma elevação significativa dos níveis de IL10 durante o condicionamento de um modo geral, constataram apenas um discreto aumento transitório de IL10 um dia após infusão de ATG, mas de modo geral, as concentrações ficaram próximas ou abaixo do valor de detecção (ANDERSEN et al. 2005).

Durante a ocorrência de mucosite, em 38,5% foram detectados valores elevados de IL10, portanto a grande maioria dos que desenvolveram esta complicação apresentaram índices indetectáveis, o que vem de encontro aos resultados de SCHAUER et al. (2010), que publicou que baixos níveis circulantes de IL10 foram relacionados com maior probabilidade de desenvolvimento de mucosite GIII/IV associada à quimioterapia⁸⁸ Nos quadros de diarreia, 35.4% tiveram níveis mais altos de IL10. É conhecido que esta citocina é fundamental na manutenção da microbiota intestinal e na prevenção de processos inflamatórios intestinais. Defeitos no gene responsável pela transcrição de IL10, levam a inflamação intestinal por distúrbio na relação simbiótica entre hospedeiro e a microbiota intestinal (CARIO 2010).

Quando analisamos a detecção do sTLR2 nas amostras de soro dos transplantados, constatamos que 24 (40%) apresentavam níveis detectáveis no momento da admissão, 22 (36.7%) na infusão e 27 (45%) das amostras na alta hospitalar. Assim como durante a ocorrência de febre 30 (55.5%) destas amostras apresentavam elevação de sTLR2, 19 (61%) na diarreia e 10 (77%) durante quadro de mucosite.

Sabemos que os receptores Toll-like atuam no reconhecimento de antígenos e na indução de genes associados com resposta antimicrobiana, modulando a resposta imune adaptativa. TLR2 reconhece padrões moleculares associados a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo lipopeptídeos, lipoproteínas, ácido lipoteicóico, zymosan e componentes de peptidoglicanos (DZIARSKI e GUPTA 2000; GEORGEL et al. 2005; GOODRIDGE e UNDERHILL 2008). RABY et al. (2009) demonstraram a capacidade de sTLR2 em controlar a resposta inflamatória

mediada por TLR2, sendo que sTLR2 é a única forma solúvel dos TLR em mamíferos identificados até o momento, sendo normalmente liberada por monócitos e estando presente no plasma, leite, saliva humanos e em lavado peritoneal de murinos. Ela parece proteger da excessiva ação de TLR2, evitando os efeitos deletérios resultantes. Esta regulação exercida pela forma solúvel sobre o TLR2 se dá pela sua capacidade de atuar como receptor microbiano falso (*decoy receptor*) e pela sua capacidade de romper a interação de TLR2 com seu correceptor TLR1/TLR6, contribuindo para uma resposta imune inata eficiente e controlada contra agentes microbianos (RABY et al. 2009). Encontramos em nossos resultados que 55.5% dos casos de febre apresentavam elevação dos níveis de sTLR2 nas amostras de soro, e dentre estes, oito pacientes apresentaram níveis extremamente elevados de sTLR2, ao analisarmos mais profundamente estes indivíduos constatamos que o que tiveram em comum foi a presença de febre. Em um destes não identificamos nenhum agente causal, porém em 2 deles foi identificado em culturas a presença de *Staphylococcus epidermidis* (SE) em hemoculturas de sangue coletado por cateter central, ponta de cateter e sangue periférico, em outros 2 identificamos *S. hominis*, nos demais encontramos um paciente com *p. aeruginosa*, outro com cândida papapsilosis e uma provável encefalite herpética e por último um paciente apresentava hepatite B ativa desde a internação e não teve nenhum agente etiológico identificado em suas culturas. . Sabemos que o *Staphylococcus epidermidis* faz parte da microbiota da pele e é frequentemente associado a infecções de cateter central e em bacteremias, especialmente em pacientes imunocomprometidos. STRUNK et al. (2010) mostraram o papel do TLR2 no reconhecimento e eliminação do SE *in vivo* e *in vitro*. Utilizando células transfectadas com TLR2, camundongos deficientes em TLR

e anticorpos anti-TLR, estudaram o reconhecimento de SE mediado por TLR2 e demonstraram que o SE ativa a produção de citocinas em sangue total humano via TLR2; que este receptor atua principalmente no reconhecimento de baixas concentrações de SE em macrófagos murinos, já que em altas concentrações SE pode ativar outras vias independentes de TLR2; verificaram ainda que este receptor intermedia precocemente (1h) a produção de citocinas após infusão venosa de SE *in vivo* e, por último, ainda concluíram que TLR2 tem papel fundamental e seletivo em mediar a eliminação da bacteremia (SPILLER 2008; STRUNK et al. 2010; LAI et al. 2010).

Um outro agente etiológico importante em infecções, particularmente em pacientes imunocomprometidos é o *S aureus* que frequentemente está associado a infecções de cateteres venosos centrais e bacteremias, representa um risco de infecções graves e contribuem para o aumento da mortalidade em transplantados de células hematopoiéticas. Há evidências que TLR2 tem papel crucial no reconhecimento e resposta á infeções por *S. aureus*. Este agente conduziu a aumentos significantes da expressão celular de TLR2 durante o curso de abscessos cerebrais. A alta versatilidade de reconhecimento de ligantes por TLR2 possivelmente se deve a sua ação em forma de heterodímeros com TLR1 ou TLR6. A ativação de TLR2 por *S aureus* ainda precisa ser melhor estudada, assim como sua participação durante a formação de biofilme (PIETROCOLA et al. 2011).

É sabido que a hiperestimulação ou desregulação da resposta imune inata provoca danos teciduais podendo resultar em sérias condições inflamatórias como disfunção pulmonar, renal, cardíaca, falência de múltiplos órgãos, choque séptico ou processos inflamatórios crônicos (RABY et al. 2009). TLR2, sendo um potente

indutor de interleucina 10, que inibe as funções efetoras de macrófagos e células dendríticas, atua limitando o desenvolvimento de uma resposta imune exagerada (CARIO 2008b). Dos 60 pacientes incluídos no nosso estudo, 4 evoluíram com insuficiência respiratória, 4 desenvolveram sepse, porém não dispomos de amostras sanguíneas colhidas nestes momentos para análise das proteínas envolvidas nestes processos inflamatórios.

Nossos resultados também mostraram níveis elevados de sTLR2 em 19 (61%) pacientes na vigência de quadros de diarreia e 10 (77%) durante o quadro de mucosite. Em nosso estudo, foram considerados e incluídos nas análises, apenas os pacientes que apresentaram mucosite oral, porém sabemos que todo o trato gastrointestinal é acometido pelo efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos, assim como a microbiota é alterada, seja pela imunossupressão, ou pelo uso de antimicrobianos, alterando os mecanismos de defesa presentes em toda a extensão da mucosa gastrointestinal. Não podemos claramente separar estes dois eventos diarreia e mucosite, pois na maior parte das vezes a diarreia ocorre em função do dano à mucosa intestinal causado pela ação direta do condicionamento, ou seja, mucosite intestinal.

Estudando o papel do TLR2 nos processos inflamatórios gastrointestinais, nenhuma publicação foi encontrada sobre a ação do TLR2 na mucosa oral especificamente, porém vemos que, na última década vários estudos tem chamado a atenção para os TLRs, considerando-os como os mediadores chave na defesa inata do intestino; responsáveis por manter a integridade da mucosa, além da homeostase da microbiota intestinal (MESSLIK et al. 2009). No intestino, TLR2 e TLR4 estão presentes normalmente, apenas em pequenas quantidades, nas células epiteliais e

células mononucleares da lamina própria, mantendo o estado basal de ativação. Mecanismos celulares e muitos reguladores negativos atuam impedindo a ativação do TLR pela presença da microbiota. Qualquer insulto a mucosa intestinal pode resultar em dano tecidual com ativação da imunidade inata e adaptativa, seguido por recrutamento celular, proliferação e migração, terminando com a cicatrização da ferida (CARIO 2008a).

Modelos murinos têm mostrado que o controle da função do TLR na mucosa intestinal é exercido de forma altamente interativa entre fatores ambientais, genéticos e fatores inerentes à imunidade do hospedeiro (CARIO 2010). Acreditamos que a aplasia medular prolongada, além do uso de antibióticos, alterando a composição da microbiota, durante o transcorrer do processo de transplante, possam promover um desequilíbrio neste mecanismo de defesa, podendo levar a sinalização aberrante do TLR e contribuindo para o desencadeamento de processos inflamatórios intestinais. Alterações na composição da microbiota, por si só, podem levar a diferente modulação da responsividade do TLR, resultando em uma atividade predominantemente pró-inflamatória, culminando em dano a mucosa intestinal (CARIO et al. 2007).

Verificamos ainda que, a variação da concentração de sTLR2 no decorrer do tratamento não se correlacionou com o tempo de pega medular ($p=0,46$). Porém, mostrou-se associada ao tempo de hospitalização ($p=0,03$), indicando que quanto maior o tempo de hospitalização maior a variação da concentração deste receptor. Isso pode decorrer, por exemplo, de uma maior probabilidade de exposição a agentes bacterianos intra-hospitalares nos pacientes que permanecem internados por mais tempo, com o desenvolvimento de infecções secundárias e consequente maior

elevação ou elevação mais sustentada deste marcador. Ou ainda, esta elevação encontrada pode ser decorrente da ocorrência de maior número de complicações ou complicações mais severas, que demandaram maior tempo de hospitalização.

Nossos resultados sugerem haver uma associação entre a elevação da forma solúvel de TLR2 e o desenvolvimento destas complicações (mucosite, diarreia e febre), o que talvez merecesse uma investigação numa população maior e a comparação com os níveis de indivíduos sãos ou submetidos a outras formas de quimioterapia menos intensa.

Limitações do Estudo

Dentre os objetivos propostos neste estudo, não conseguimos verificar a correlação entre os níveis das diferentes proteínas entre si. Isto ocorreu devido ao número reduzido de amostras com níveis detectáveis, com exceção de sTLR2. Possivelmente, em uma casuística maior isto poderia ser realizado. Além disto, entre os eventos que pretendíamos correlacionar com os níveis dos marcadores, não obtivemos êxito na coleta de amostras nos casos de sepse, insuficiência respiratória e no momento da identificação da necessidade de terapia intensiva. Isto provavelmente ocorreu em virtude de alguns fatores; a) estarem previstas apenas coletas de sangue para os dois primeiros eventos que o paciente apresentasse, pois optamos por evitar coletas de muitas amostras sanguíneas em uma população já com grande potencial transfusional; b) por falha na identificação da sepse e insuficiência respiratória; c) por recusa de pacientes no momento da coleta destas amostras; d) dificuldade de coleta das amostras no momento da transferência para UTI, ou dificuldade logística na coleta destas amostras por colaboradores deste setor.

Nossos resultados podem ainda ter sido prejudicados, pela heterogeneidade da população quanto às patologias estudadas e consequentes esquemas de condicionamento, bem como pelo número de indivíduos admitidos. Além disso, talvez a utilização de kits de detecção com limites diferentes dos utilizados, nos permitisse eventualmente perceber variações da IL10, IL12 e IL17 numa faixa inferior a que avaliamos e nos permitisse dosar a proteína C-reativa, que encontrava-se bastante elevada em nossas amostras.

6 CONCLUSÕES

- 1 Foi observado uma variação significativa do nível sérico de sTLR2 entre a admissão e alta dos pacientes na unidade de TMO em associação com o desenvolvimento de febre, diarreia e mucosite.
- 2 A variação dos níveis de sTLR2 entre a admissão e alta não se associou com nenhuma outra variável clínica e de tratamento.
- 3 A maior parte dos pacientes não apresentaram elevações significativas de IL12 e IL17.
- 4 Embora tenhamos observado variações nas concentrações séricas de IL10, estas não se associaram com os desfechos estudados.
- 5 Diarreia esteve associada com o diagnóstico de mieloma múltiplo e com a realização prévia de radioterapia.
- 6 O uso de antifúngico se correlacionou com a ocorrência de sepse.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymous] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med** 1992; 20:864-74.

[Anonymous] The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med** 1993; 329:987-94.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Cellular and molecular immunology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. Cytokines; p.267-301.

Anaissie E. **Overview of infections following hematopoietic cell transplantation**. 2010. Available from: <URL:<http://www.uptodate.com/contents/overview-of-infections-following-hematopoietic-cell-transplantation>> [2010 mar 22].

Andersen J, Heilmann C, Jacobsen N, Bendtzen K, Müller K. Cytokines and soluble tumour necrosis factor I receptor levels during pretransplant conditioning in allogeneic stem-cell transplantation. **Int Immunopharmacol** 2005; 5:67-71.

Arber C, Passweg JR, Fluckiger U, et al. C-reactive protein and fever in neutropenic patients. **Scand J Infect Dis** 2000; 32:515-20.

Arbibe L, Mira JP, Teusch N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. **Nat Immunol** 2000; 1:533-40.

Arndt PG, Fantuzzi G, Abraham E. Expression of interleukin-18 in the lung after endotoxemia or hemorrhage-induced acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2000; 22:708-13.

Baitalle R, Harousseau JL. Multiple Myeloma. **N Eng J Med** 1997; 336:1657-64.

Baker KS, Roncarolo MG, Peters C, Bigler M, DeFor T, Blazar BR. High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. **Bone Marrow Transplant** 1999; 23:1123-9.

Barnes RA, Stallard N. Severe infections after bone marrow transplantation. **Curr Opin Crit Care** 2001; 7:362-6.

Bartlett NL. Therapies for relapsed Hodgkin lymphoma: transplant and non-transplant approaches including immunotherapy. **Hematology** 2005; 245-51.

Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. **J Clin Oncol** 1988; 6:1562-8.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical coordination. **Am J Respir Crit Care Med** 1994; 149:818-24.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. **Nature** 2004; 430:257-63.

Blijlevens NM, Donnelly JP, DePauw BE. Inflammatory response to mucosal barrier injury after myeloablative therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplant** 2005; 36:703-7.

Blijlevens NM, Donnelly JP, Meis JF, De Keizer MH, De Pauw BE. Procalcitonin does not discriminate infection from inflammation after allogeneic bone marrow transplantation. **Clin Diagn Lab Immunol** 2000; 7:889-92.

Bolwell BJ, Kalaycio M, Sobecks R, et al. A multivariable analysis of factors influencing mucositis after autologous progenitor cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2002; 30:587-91.

Bonnotte B, Burdiles AM, Chehimi J, et al. Serum interleukin-12 levels in patients undergoing allogeneic or autologous bone marrow transplantation. **Eur Cytokine Netw** 1996; 7:389-94.

Buchmann I, Meyer RG, Mier W, Haberkorn U. Myeloablative radioimmunotherapy in conditioning prior to haematological stem cell transplantation: closing the gap between benefit and toxicity? **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2009; 36:484-98.

Car BD, EngVM, Lipman JM, Anderson TD. The toxicology of interleukin-12: a review. **Toxicol Pathol** 1999; 27:58-63.

Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. **Gastroenterology** 2007; 132:1359-74.

Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. **Mucosal Immunol** 2008a; 1(Suppl 1):S62-6.

Cario E. Therapeutic impact of toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: a multiple-edged sword. **Inflamm Bowel Dis** 2008b; 14:411-21.

Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. **Inflamm Bowel Dis** 2010; 16:1583-97.

Carregaro F, Carta A, Cordeiro JA, Lobo SM, Silva EH, Leopoldino AM. Polymorphisms IL10-819 and TLR-2 are potentially associated with SEPSIS in Brazilian patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2010; 105:649-56.

Crawford SW, Petersen FB. Long-term survival from respiratory failure after marrow transplantation for malignancy. **Am Rev Respir Dis** 1992; 145:510-4.

Cutler C, Antin JH. An overview of hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Chest Med** 2005; 26:517-27.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J Exp Med** 1992; 176:1387-98.

Dander E, Balduzzi A, Zappa G, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. **Transplantation** 2009; 88:1261-72.

Doni A, Michela M, Bottazzi B, et al. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. **J Leukoc Biol** 2006; 79:797-802.

Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, et al. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. **J Immunol** 2009; 182:7244-53.

Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. **Cancer** 1975; 36:842-54.

Dziarski R, Gupta D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. **J Endotoxin Res** 2000; 6:401-5.

Eilers J, Million R. Prevention and management of oral mucositis in patients with cancer. **Semin Oncol Nurs** 2007; 23:201-12.

Ferrà C, de Sanjosé S, Gallardo D, et al. IL6 and IL8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. **Haematologica** 1998; 83:1082-7.

Fleischhack G, Kambeck I, Cipic D, Hasan C, Bode U. Procalcitonin in pediatric cancer patients: its diagnostic relevance is superior to that of C-reactive protein, interleukin 6, interleukin 8, soluble interleukin 2 receptor and soluble tumour necrosis factor receptor II. **Br J Haematol** 2000; 111:1093-102.

Foley R, Couban S, Walker I, et al. Monitoring soluble interleukin-2 receptor levels in related and unrelated donor allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** 1998; 21:769-73.

Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis** 2011; 52:e56-93.

Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, et al. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial SEPSIS. **J Immunol** 2009; 182:7846-54.

Fuji S, Kim SW, Fukuda T, et al. Preengraftment serum C-reactive protein (CRP) value may predict acute graft-versus-host disease and nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant** 2008; 14:510-7.

Georgel P, Crozat K, Lauth X, et al. A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with gram-positive bacteria. **Infect Immun** 2005; 73:4512-21.

Goodridge HS, Underhill DM Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. **Handb Exp Pharmacol** 2008; (183):87-109.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 2002; 111:927-30.

Gratwohl A, Baldomero H, Demirer T, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for solid tumor in Europe. **Ann Oncol** 2004; 15:653-60.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. **J Clin Oncol** 2005; 23:3412-20.

Guillaume T, Sekhavat M, Rubinstein DB, Hamdan O, Leblanc P, Symann ML. Defective cytokine production following autologous stem cell transplantation for solid tumors and hematologic malignancies regardless of bone marrow or peripheral origin and lack of evidence for a role for interleukin-10 in delayed immune reconstitution. **Cancer Res** 1994; 54:3800-7.

Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med** 1998; 962-8.

Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **N Engl J Med** 1998; 339:1506-14.

Hauber HP, Mikkila A, Erich JM, et al. TNF, interleukin-10 and interleukin-18 expression in cells of the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary complications following bone marrow or peripheral stem cell transplantation: a preliminary study. **Bone Marrow Transplant** 2002; 30:485-90.

Hempel L, Korholz D, Nussbaum P, Bönig H, Burdach S, Zintl F. High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** 1997; 20:365-8.

Hill GR. Inflammation and bone marrow transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant** 2009; 15(1 Suppl):139-41.

Hirota K, Ahlfors A, Duarte JH, Stockinger B Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. **EMBO reports** 2012; 13:113–120.

Hodgson DC, Mikhael J, Tsang RW. Plasma cell myeloma and plasmacytoma. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. **Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. P.1790-800.

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annu Rev Immunol** 2009; 27:313-38.

Khoury IF, Romaguera J, Kantarjian H, et al. Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 1998; 16:3803-9.

Kim MK, Kim S, Lee SS, et al. High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for peripheral T-cell lymphoma: complete response at transplant predicts survival. **Ann Hematol** 2007; 86:435-42.

Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. **Curr Top Microbiol Immunol** 2002; 270:121-44.

Klumb CE. Biologia e patogênese dos linfomas não Hodgkin de origem B na infância: uma revisão. **Rev Bras Cancerol** 2001; 47:291-1.

Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. **Immunity** 2004; 21:467-76.

Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. **Am J Resp Crit Care Med** 2004; 170:22-48.

Kumar S, DeLeve LD, Kamath PS, Tefferi A. Hepatic veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) after hematopoietic stem cell transplantation. **Mayo Clin Proc** 2003; 78:589-98.

Labonte L, Iqbal T, Zaidi MA, et al. Utility of comorbidity assessment in predicting transplantation-related toxicity following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. **Biol Blood Marrow Transplant** 2008; 14:1039-44.

Lai Y, Cogen AL, Radek KA, et al. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. **J Invest Dermatol** 2010; 130:2211-21.

LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. **J Immunol** 2003; 171:6680-9.

Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. **Mol Cells** 2007; 23:1-10.

Liem LM, van Houwelingen HC, Goulmy E. Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation. **Transplantation** 1998; 66:863-71.

Ljungman P, Andersson J, Sparrelid E. [Infections following bone marrow transplantation]. **Nord Med** 1995; 110:320-1.

Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol** 2009; 183:1279-90.

Marriott I. Osteoblast responses to bacterial pathogens: A previously unappreciated role for bone-forming cells in host defense and disease progression. **Immunol Res** 2004; 30:291-308.

McCann S, Schwenkglenks M, Bacon P, et al. The prospective oral mucositis audit: relationship of severe oral mucositis with clinical and medical resource use outcomes in patients receiving high-dose melphalan or BEAM-conditioning chemotherapy and autologous SCT. **Bone Marrow Transplant** 2009; 43:141-7.

McNeer JL, Kletzel M, Rademaker A, et al. Early elevation of C-reactive protein correlates with severe infection and nonrelapse mortality in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant** 2010; 16:350-7.

Messlik A, Schmechel S, Kisling S, et al. Loss of Toll-like receptor 2 and 4 leads to differential induction of endoplasmic reticulum stress and proapoptotic responses in the intestinal epithelium under conditions of chronic inflammation. **J Proteome Res** 2009; 8:4406-17.

Min CK, Lee WY, Min DJ, et al. The kinetics of circulating cytokines including IL6, TNF α , IL8 and IL10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2001; 28:935-40.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Linfoma Não Hodgkin**. Disponível em: <URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.html> [2012a fev 5]

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Linfoma de Hodgkin**. Disponível em: <URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.html> [2012b fev 5]

Mohty M, Blaise D, Faucher C, et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. **Blood** 2005; 106:4407-11.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. **Ann Rev Immunol** 1993; 11:165-90.

Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, da Silva JS, Ferreira SH, Liew FY. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial SEPSIS induced by cecal ligation and puncture. **J Immunol** 2006; 177:3218-24.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, et al. **Applied linear statistical models**. 5th ed. Chicago: Homewood; 2005. Random and mixed effects models; p.1030-86.

Nichols JR, Aldrich AL, Mariani MM, Vidlak D, Esen N, Kielian T. TLR2 deficiency leads to increased Th17 infiltrates in experimental brain abscesses. **J Immunol** 2009; 182:7119-30.

Nicola P, Romani C, Cupelli L, et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. **Haematologica** 2007; 92:222-31.

Novak U, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular biology of lymphomas. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles and practice of oncology**. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. Cap.125.

Novelli F, Casanova JL. The role of IL-12, IL-23 and IFN-gamma in immunity to viruses. **Cytokine Growth Factor Rev** 2004; 15:367-77.

Nucci M. Epidemiologia das infecções fúngicas em transplante de células tronco hematopoiéticas. **Prat Hosp** 2007; 52:56-7.

Numata A, Miyamoto T, Ohno Y, et al. Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. **Bone Marrow Transplant** 2010; 45:311-6.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce TH1 development. **Nat Immunol** 2009; 9:929-32.

Offidani M, Corvatta L, Olivieri A, et al. Infectious complications after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation followed by G-CSF. **Bone Marrow Transplant** 1999; 24:1079-87.

Ortega M, Rovira M, Almela M, de la Bellacasa JP, Carreras E, Mensa J. Measurement of C-reactive protein adults with febrile neutropenia after hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2004; 33:741-4.

Ortega M, Rovira M, Filella X, et al. Prospective evaluation of procalcitonin in adults with non-neutropenic fever after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2006; 37:499-502.

Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin Exp Immunol** 2007; 147:199-207.

Pasquini MC, Wang Z. **Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR summary slides**. 2011. Available from: <URL:<http://www.cibmtr.org>> [2012 jan 5].

Paton EJA, Coutinho MA, Voltarelli JC. Diagnóstico e tratamento de complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoéticas. **Medicina (Ribeirão Preto)** 2000; 33:264-77.

Pechumer H, Wilhelm M, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-6 (IL-6) levels in febrile children during maximal aplasia after bone marrow transplantation (BMT) are similar to those in children with normal hematopoiesis. **Ann Hematol** 1995; 70:309-12.

Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. **Int J Artif Organs** 2011; 34:799-810.

Pihusch M, Pihusch R, Fraunberger P, et al. Evaluation of C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin levels in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **Eur J Haematol** 2006; 76:93-101.

Pinheiro JC, Bates DM. **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. New York: Springer; 2000a. Linear mixed-effects models; p.3-56.

Pinheiro JC, Bates DM. **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. New York: Springer; 2000b. Theory and computational methods for MLE models; p.57-96.

Pinheiro JC, Bates DM. **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. New York: Springer; 2000c. Fitting linear mixed-effects models; p.133-99.

Pinter-Brown LC, Casciato DA. Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma. In: Casciato DA, editor. **Manual of clinical oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.431-70.

Prat C, Sancho JM, Dominguez J, et al. Evaluation of procalcitonin, neopterin, C-reactive protein, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia. **Leuk Lymphoma** 2008; 49:1752-61.

Presterl E, Staudinger T, Pettermann M, et al. Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with SEPSIS. **Am J Respir Crit Care Med** 1997; 156:825-32.

Raby AC, Le Boudier E, Colmont C, et al. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. **J Immunol** 2009; 183:506-17.

Reich G, Mapara MY, Reichardt P, Dörken B, Maschmeyer G. Infectious complications after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: comparison between patients with lymphoma or multiple myeloma and patients with solid tumors. **Bone Marrow Transplant** 2001; 27:525-9.

Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, et al. High dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in patients with peripheral T-cell lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy. The GEL-TAMO experience. **Haematologica** 2003; 88:1372-7.

Sakata N, Yasui M, Okamura T, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa K. Post-transplant complications kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant** 2001; 27:1153-61.

Samuels BL, Bitran JD. High-dose intravenous melphalan: a review. **J Clin Oncol** 1995; 13:1786-99.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Immunol** 2010; 10:170-81.

Sauer M, Tiede K, Fuchs D, Gruhn B, Berger D, Zintl F. Procalcitonin, C-reactive protein, and endotoxin after bone marrow transplantation: identification of children at high risk of morbidity and mortality from sepsis. **Bone Marrow Transplant** 2003; 31:1137-42.

Sauer M, Tiede K, Volland R, Fuchs D, Zintl F. [Procalcitonin in comparison to C-reactive protein as markers of the course of sepsis in severely immunocompromised children after bone marrow transplantation]. **Klin Padiatr** 2000; 212:10-5.

Scales DC, Thiruchelvam D, Kiss A, Sibbald WJ, Redelmeier DA. Intensive care outcomes in bone marrow transplant recipients: a population-based cohort analysis. **Crit Care** 2008; 12:R77.

Schauer MC, Holzmann B, Peiper M, Friess H, Knoefel WT, Theisen J. Interleukin-10 and -12 predict chemotherapy-associated toxicity in esophageal adenocarcinoma. **J Thorac Oncol** 2010; 5:1849-54.

Schmidt N, Palma J, King A, Santolaya ME. [C reactive protein and procalcitonin levels for the diagnosis of invasive bacterial infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients]. **Rev Med Chil** 2007; 135:982-9.

Schmit-Pokorny K. Expanding indications for stem cell transplantation. **Semin Oncol Nurs** 2009; 25:105-14.

Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Monitoring of C-reactive protein after allogeneic bone marrow transplantation identifies patients at risk of severe transplant-related complications and mortality. **Bone Marrow Transplant** 1998; 79-85.

Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. **Leukemia** 2003; 17:1150-6.

Schots R, Van Riet I, Othman TB, et al. An early increase in serum levels of C-reactive protein is an independent risk factor for the occurrence of major complications and 100-day transplant-related mortality after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2002; 30:441-6.

Schots R. Recent advances in myeloma treatment. **Transf Apheresis Sci** 2011; 44:223-9.

Sherwin C, Broadbent R, Young S, et al. Utility of interleukin-12 and interleukin-10 in comparison with other cytokines and acute-phase reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. **Am J Perinatol** 2008; 25:629-36.

Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. **Blood** 2002; 100:2642-9.

Songhet P, Barthel M, Röhn TA, et al. IL-17A/F-signaling does not contribute to the initial phase of mucosal inflammation triggered by *S. Typhimurium*. **PLoS One** 2010; 5:13804.

Sorrer ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. **Blood** 2005; 106:2912-9.

Spiller S, Elson G, Ferstl R, et al. TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. **J Exp Med** 2008; 205:1747-54.

Strobel ES, Bauchmüller K, Ihorst G, Engelhardt M. Frequency, severity and risk factors for oral mucositis after BEAM conditioning and autologous peripheral blood stem cell transplantation: a single center analysis and review of the literature. **Leuk Lymphoma** 2007; 48:2255-60.

Strunk T, Power Coombs MR, Currie AJ, et al. TLR2 mediates recognition of live *Staphylococcus epidermidis* and clearance of bacteremia. **PLoS One** 2010; 5:e10111.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol** 2004; 16:3-9.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in 1999; 11:443-51. recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity** 1999; 11:443-51.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell** 2010; 140:805-20.

Tan SS, Uyl-de Groot CA, Huijgens PC, Fibbe WE. Stem cell transplantation in Europe: trends and prospects. **Eur J Cancer** 2007; 43:2359-65.

Tegg EM, Griffiths AE, Lowenthal RM, et al. Association between high interleukin-6 levels and adverse outcome after autologous haemopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 2001; 28:929-33.

Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N Engl J Med** 1957; 257:491-6.

van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Verschueren IC, et al. Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. **Shock** 2010; 34:407-11.

Varney ML, Ino K, Ageitos AG, Heimann DG, Talmadge JE, Singh RK. Expression of interleukin-10 in isolated CD8⁺ T cells and monocytes from growth factor-mobilized peripheral blood stem cell products: a mechanism of immune dysfunction. **J Interferon Cytokine Res** 1999; 19:351-60.

Vasselon T, Detmers PA, Charron D, Haziot A. TLR2 recognizes a bacterial lipopeptide through direct binding. **J Immunol** 2004; 173:7401-5.

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

[WHO] World Health Organization. **Age standardized death rates, by WHO region**. Available from: <URL:http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/regions/situation_trends_deaths/en/index.html> [2012 jan 12]

Yates F. Contingency table involving small numbers and the χ^2 test. **J R Stat Soc Suppl** 1934; 2:217-35.

Yoshimura C, Nomura S, Kanazawa S, Kuwana M, Yamaguchi K, Fukuhara S. Comparison of interleukin-12 with lung cancer and malignant lymphoma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128:29-36.

Anexo 1 - Escala de Comorbidade

HCT-CI		
Comorbidades	Definições	Escore
Arritmia	Fibrilação ou flutter atrial, síndrome do nódulo sinusal, ou arritmias ventriculares	1
Cardíaca	Doença coronariana, * insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio, ou FE $\leq$ 50%	1
Doença inflamatória intestinal	Doença de Crohn ou colite ulcerativa	1
Diabetes	Necessitando de tratamento com insulina ou hipoglicemiantes orais	1
Doença vascular cerebral	Isquemia transitória ou acidente vascular cerebral	1
Distúrbio psiquiátrico	Depressão ou ansiedade que requerem tratamento psiquiátrico	1
Hepática leve	Hepatite crônica, bilirrubina > LSN a 1,5X LSN, ou TGO/TGP > LSN a 2,5X LSN	1
Obesidade	Índice de massa corporal > 35 kg/m ²	1
Infecção	Necessitando continuação de tratamento antimicrobiano após o dia zero	1
Reumatológica	Lupus eritematoso, artrite reumatóide, polimiosite, doenças do tecido conjuntivo, ou polimialgia reumática	2
Úlcera péptica	Necessitando de tratamento	2
Renal moderada/grave	Creatinina sérica de > 2 mg / dL, em diálise ou transplante renal prévio	2
Pulmonar moderada	DLco e/ou FEV1 66% -80% ou dispnéia durante atividade leve	2
Tumores sólidos prévios	Antecedente de tumores sólidos tratados, exceto câncer de pele não melanoma	3
Doença cardíaca valvar	Exceto prolapso da valva mitral	3
Pulmonar grave	DLco e/ou FEV1 $\leq$ 65% ou dispnéia em repouso ou exigindo oxigênio	3
Hepática moderada / grave	Cirrose hepática, bilirrubina > 1,5X LSN ou TGO/TGP > 2,5X LSN	3

FE indica a fração de ejeção, LSN, o limite superior do normal; DLco, capacidade de difusão de monóxido de carbono.

*Uma ou mais artéria coronariana com estenose que necessite de tratamento médico, stent ou cirurgia de revascularização.

**Escore de 1 - 2 representam 1.5 vezes maior chance de morte não relacionada a recaída; score $\geq$ 3 representam 3 vezes maior chance.

Anexo 2 - Ficha de Coleta de Dados

Iniciais: _____ RGH: _____ Idade: _____ Sexo: F (0) M (1)

Cor: Branca (1) Negra (2) Parda (3) Asiático (4) NA (5)

Diagnóstico: MM (0) LH (1) LNH (2) Data diagnóstico: __/__/__

Indicação: Doença refratária (1) Doença recaída (2) Consolidação de primeira linha (3) Outra (4) Qual:

Melhor resposta atingida pré-TAMO: RC (1) VGPR (2) PR (3) DE (4) PD (5) NA (6)

Estadiamento:

Linfomas (Ann-Arbor)

I (1) II (2) III (3) IV (4)

Sintomas B: Sim (1) Não (2)

Bulky: Sim (1) Não (2)

IPI (LNH):

IPS (LH avançado):

Grupo de risco (LH precoce):

Mieloma

DS: IA (1) IB (2) IIA (3) IIB (4) IIIA (5) IIIB (6)

ISS: 1 (1) 2 (2) 3 (3)

Tratamentos Prévios:

Quimioterapia Sim (1) Não (2)

Número de esquemas 1 (1) 2 (2) 3 (3) Mais de 3 (4)

Quais:	Datas de início:	Datas de término:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Radioterapia Sim (1) Não (2)

Data de início:

Data de término:

Comorbidades: DM (1) HAS(2) DPOC (3) IRC (4) ICo (5) Dislipidemia (6) Hipotireoidismo (7) Outra (8) Qual? _____

Escore HCT-CI : n° _____ comorbidade _____ ECOG 0 (1) 1 (2) 2 (3)

Condicionamento: BEAM (1) CBV (2) Mel200 (3) Mel140 (4) Outro (4) Qual:

Data de início:

Data de término:

Exames na admissão: : Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Data da infusão da medula (D0):

Exames no D zero: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Data do primeiro evento:

Hora do evento:

Hora da coleta da amostra de sangue: 24h _____ 72h _____

Tipo do evento: Mucosite (1) Febre (2) Diarréia (3) Insuficiência respiratória (4) SEPSE (5) Outro (6) Qual:

Grau inicial: I (1) II (2) III (3) IV (4)

Grau mais alto: I (1) II (2) III (3) IV (4)

Data de início:

Data de término:

Exames no evento: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Exames 24h após: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Exames 72h após: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Data da resolução do evento:

Data do segundo evento:

Hora do evento:

Hora da coleta da amostra de sangue: 24h _____ 72h _____

Tipo do evento: Mucosite (1) Febre (2) Diarréia (3) Insuficiência respiratória (4) SEPSE (5) Outro (6) Qual:

Grau inicial: I (1) II (2) III (3) IV (4)

Grau mais alto: I (1) II (2) III (3) IV (4)

Data de início:

Data de término:

Exames no evento: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Exames 24h após: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Exames 72h após: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Data da resolução do evento:

Necessidade de suporte intensivo: Sim (1) Não (2)

Motivo: _____

Uso de antibiótico: Sim (1) Não (2)

Quais:

Datas de início:

Datas de término:

Nutrição parenteral: Sim (1) Não (2)

Data de início:

Data de término:

Data da pega:

Data da alta:

Exames na alta: Hb: Ht: Leuc: No: Eo:

Baso: Ly; Mo: Plaq: TAP:

Melhor resposta atingida pós-TAMO: RC (1) VGPR (2) PR (3) DE (4) PD (5) NA (6)

Morte: Sim (1) Não (2) Causa:

Data da morte (quando ocorrer):

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL10, IL12, IL17 e sTLR2 E SUA RELAÇÃO COM COMPLICAÇÕES EM PACIENTES SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA EM ALTA DOSE COM RESGATE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS PROGENITORAS AUTÓLOGAS

Este formulário de consentimento contém informações a respeito da participação no estudo que está sendo proposto para você. Uma vez compreendido os objetivos do estudo e havendo o seu interesse em participar do mesmo, será solicitado a sua assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Você receberá uma cópia para seu arquivo. Se você achar adequado, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

A sua decisão de participar deste estudo é voluntária. Se você decidir não participar deste estudo de pesquisa, você não será penalizado de nenhuma forma, nem perderá nenhum benefício ao qual teria direito de outra forma. O mesmo princípio será válido se você concordar em participar do estudo agora e mudar de idéia depois.

Se os investigadores descobrirem algum fato novo com relação aos tratamentos em estudo que possa afetar a sua decisão de participar ou não do estudo, você será informado assim que possível, para que possa tomar novamente uma decisão consciente se deseja continuar a participar do estudo de pesquisa.

Mesmo que você decida participar deste estudo de pesquisa, o seu médico tem o direito de encerrar a sua participação posteriormente por qualquer dos motivos a seguir: seria prejudicial se você continuasse; você não seguir os procedimentos do estudo conforme orientado pelo pesquisador responsável pelo estudo e o mesmo decidir encerrar o estudo. Além disso, o Comitê de Ética também poderá encerrar o estudo.

Por fim, se você decidir encerrar a sua participação no estudo de pesquisa, deve informar ao seu médico do estudo ou à pessoa de contato do estudo no consultório do seu médico. Eles irão se certificar se os procedimentos apropriados

foram seguidos e que uma visita final ao consultório seja realizada para a sua segurança.

Proposta e plano de tratamento

O tratamento convencional de pacientes com doenças como mieloma múltiplo e linfomas recaídos (que voltaram) e refratários (que não responderam ao tratamento) resulta em baixas taxas de controle a longo prazo. Com a finalidade aumentar o tempo de controle destes tumores (mieloma múltiplo) ou chance de ficar curado (linfomas), submeteremos você, que se encontra em alguma destas condições, à quimioterapia em doses elevadas (para tentar eliminar as células do tumor mais resistentes) e depois infundiremos no seu sangue as suas próprias células-tronco (células que existem na medula óssea – tutano – capazes de regenerar todas as células do sangue) já previamente colhidas. Tal procedimento pode estar associado a um risco mais alto de desenvolvimento de algumas complicações (já explicadas no termo de consentimento do transplante) como vômitos, náuseas, dor de cabeça, falta de apetite, fraqueza, febre, infecções, diarreia, sangramentos, dor na boca e garganta, feridas na boca, ânus e vagina (mucosite), dificuldade para respirar, alterações da função do fígado ou rins, pressão baixa, taquicardia (aumento dos batimentos cardíacos), entre outros menos frequentes. Atualmente não dispomos de ferramentas para identificar que pessoas terão ou não estas complicações, ou se elas serão mais intensas ou mais fracas, mais ou menos duradouras. Assim seria muito interessante descobrir algo que possibilitasse descobrir que pessoas são mais sensíveis aos efeitos colaterais deste tratamento, e desta forma, iniciar tratamentos mais precoces e mais eficientes, ou desenvolver novas estratégias que permitam reduzir o risco aos quais estes pacientes (incluindo você) estão expostos.

Neste sentido, este estudo pretende avaliar a associação de um conjunto de proteínas (substâncias produzidas pelas células do seu corpo) presentes em seu sangue, produzidas em resposta a uma inflamação qualquer e envolvidas com o controle de diversas funções de seus órgãos, bem como com a ocorrência de complicações frequentemente verificadas durante a realização de quimioterapia em altas doses seguida resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas (transplante autólogo de medula óssea). As complicações avaliadas serão febre,

diarréia, mucosite (dor e feridas na boca), SEPSE (infecção no sangue associada com sintomas com febre, diminuição da pressão ou da temperatura, aumento do número de células brancas ou dificuldade respiratória), insuficiência respiratória (dificuldade para respirar) ou necessidade de tratamento na UTI.

Exames durante e após o tratamento

A participação neste estudo implicará na coleta de 5,0ml de sangue do braço (preferido) ou do seu cateter (você será solicitado a responder se você permite ambas as formas de coleta ou apenas uma, ao final deste termo) em alguns momentos do tratamento, a saber: na data de admissão na unidade de transplante e de 3 em 3 dias até a ocorrência de um dos eventos estudados. Também serão coletadas amostras no dia da infusão das células-tronco (imediatamente antes da infusão), no dia da ocorrência da primeira complicação (febre, mucosite, diarréia, SEPSE, insuficiência respiratória ou qualquer complicação com necessidade de tratamento em UTI a critério do médico da equipe de transplante), 24 h e 72 horas após a ocorrência desta complicação e na data da alta. Eventualmente, serão colhidas amostras de sangue também após a ocorrência de uma segunda complicação, e 24 e 72 horas após este novo evento, desde que você esteja de acordo. Caso não apresente nenhuma das complicações estudadas, as amostras serão coletadas de 3 em 3 dias até um total de 5.

Os resultados das análises destas amostras não implicarão em nenhuma mudança em seu tratamento, uma vez que se trata da avaliação de fatores para os quais não existe nenhuma evidência de algum papel com relevância e aplicação médica em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Estas amostras servirão única e exclusivamente aos objetivos deste estudo, não vindo a ser empregadas em nenhuma outra análise não vinculada a este.

Riscos

Os riscos associados a este procedimento são devidos à manipulação do cateter intravenoso (infecção do cateter) ou à punção da veia (infecção do sítio de punção), para os que serão adotadas medidas de antisepsia rigorosa, já devidamente padronizadas na rotina da Unidade de Transplante de Medula óssea do HACC.

Custos

A participação no estudo não implicará em gastos ou despesas extras para você (paciente) ou para a sua seguradora de saúde, sendo que todos os custos com a coleta e processamento das amostras já estão incluídos dentro do projeto do mesmo. Ou seja, você (e/ou seu convênio médico) não deverá pagar por qualquer procedimento ou teste exigido como parte deste estudo clínico. Você não terá nenhum ganho financeiro, e também nenhum prejuízo por participar deste estudo.

Direito de recusar e de se retirar do tratamento.

A escolha de entrar ou não neste tratamento é inteiramente sua. Caso você se recuse a participar deste estudo, você será tratada por estas terapêuticas tradicionais, sem nenhum tipo de preconceito pelo seu médico. Você tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento. Se você decidir se retirar do estudo, você será tratado (a) de maneira convencional pelos mesmos médicos, sem nenhum tipo de preconceito.

Dúvidas

Você tem o direito de fazer quaisquer perguntas relacionadas aos riscos possíveis e/ou conhecidos deste estudo bem como sobre qualquer outro aspecto do estudo, a qualquer momento.

Os médicos e pesquisadores responsáveis são: Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima e Luciane Nogueira Machado (Telefone: 2189-5000 Ramal: 1231) os quais você deverá contatar a qualquer momento em que enfrente qualquer problema ou dúvida relacionadas ao estudo. Após o horário comercial, você poderá entrar em contato no telefone (11) 2189-5000 (solicitar à telefonista para entrar em contato com o telefone celular do pesquisador principal – Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima). Se você necessita de maiores informações a respeito do estudo antes de assinar o termo de consentimento, contate os médicos ou pesquisadores acima.

Caso tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como paciente de pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (que é o responsável legal para a certificação de que os direitos dos pacientes estejam

protegidos e avaliou e aprovou a realização deste estudo neste Hospital) pelo telefone (11) 2189-5020.

Não assine este termo de consentimento se não tiver a oportunidade de fazer perguntas e tenha recebido respostas satisfatórias para todas elas.

Confidencialidade

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos sob sigilo e confidencialidade. A equipe do Patrocinador e Autoridades Regulatórias aplicáveis tem o dever de verificar os seus documentos-fonte, ou seja, seus documentos médicos originais, desde que autorizado pelo médico do estudo e pelo hospital. O objetivo é assegurar que as informações são verdadeiras e corretas. Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo.

DECLARAÇÃO DO MÉDICO OBTENDO CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu declaro que expliquei este protocolo de estudo, com todos os detalhes necessários para o(a) paciente (ou seu responsável legal) _____. No meu julgamento, houve acesso a todas informações disponíveis, incluindo os riscos e benefícios, para que se possa fazer uma decisão informada.

Assinatura do médico _____ Data ____/____/____

Nome do médico _____ CRM _____

DECLARAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

Eu declaro que li e compreendi a proposta de tratamento. Declaro também que discuti esta proposta pessoalmente com meu médico. Eu entendo os riscos da minha doença, o propósito do estudo, os métodos que serão utilizados e os riscos e benefícios da pesquisa. Entendo também que a minha entrada neste estudo é

voluntária. A assinatura deste termo de consentimento não suspende os meus direitos legais. E eu ainda tenho direitos como participante de um estudo clínico.

Assinale com um X (xis) as autorizações com as quais você concorda:

- ☐ () Concordo em participar do estudo.
- ☐ () Concordo com a retirada de sangue apenas pelo cateter.
- ☐ () Concordo com a retirada de sangue pelo cateter ou pela veia do braço.
- ☐ () Concordo com a retirada de sangue nos momentos propostos no estudo, mas incluindo apenas o primeiro evento de complicação.
- ☐ () Concordo com a retirada de sangue nos momentos propostos no estudo, incluindo após a primeira e a segunda complicação.

Assinatura do(a) paciente _____ Data ____/____/____

Nome do(a) paciente _____ R.G. _____

Anexo 4 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 10 de Maio de 2010.

Ao
Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1400/10

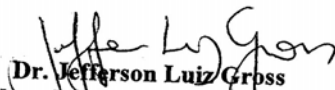
“Marcadores sorológicos de inflamação como preditores de complicações em pacientes submetidos à quimioterapia em alta dose com resgate de células hematopoiéticas progenitoras autólogas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 27/04/2010, aprovaram a realização do projeto em referência, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 6 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1