

Alexandra Fernandes Callera

**Avaliação do perfil de citocinas nas diferentes fases do transplante
autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com mieloma
múltiplo**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula
Vieira

São Paulo

2020

Alexandra Fernandes Callera

Avaliação do perfil de citocinas nas diferentes fases do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com mieloma múltiplo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Callera, Alexandra Fernandes

Avaliação do perfil de citocinas nas diferentes
fases do transplante autólogo de células-tronco
hematopoéticas em pacientes com mieloma múltiplo /
Alexandra Fernandes Callera. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Rodolfo de Paula Vieira.

Descritores: 1.Mieloma múltiplo 2.Aferese
3.Quimioterapia 4.Medula óssea 5.Transplante de
células-tronco 6.Citocinas

USP/FM/DBD-127/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Para Fernando, meu companheiro...
meu amor... minha maior inspiração!*

*Para meus filhos Gui, Callerinha e
Guga, o amor de vocês me fortalece!*

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me acompanha em todas as fases da minha vida, guiando-me e protegendo-me.

A todos os pacientes que participaram deste estudo.

Ao estimado professor Dr. Rodolfo de Paula Viera pela orientação técnica, profissionalismo e consideração com o meu trabalho.

Ao professor Dr. André Luis Lacerda Bacchi pela colaboração e incentivo.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto e São Paulo.

Aos médicos e equipes de apoio do Hospital Pio XII de São José dos Campos, especialmente da unidade de transplante de medula óssea, ambulatório, setor de quimioterapia e laboratórios.

Aos funcionários do departamento de fisiopatologia experimental, Igor e Gisele pela ajuda no decorrer deste trabalho.

A meu pai Geraldo (*in memoriam*) e para minha mãe Maria Helena, exemplo de força, o meu agradecimento por todos os ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos Gilberto, Adalberto e Valéria, agradeço pela amizade e união.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl G. Jung

RESUMO

Callera AF. *Avaliação do perfil de citocinas nas diferentes fases do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com mieloma múltiplo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

O transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TCTH – autólogo) é de fundamental importância no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (MM). Contudo, em função de sua toxicidade, diminui o número de células medulares disponíveis, altera drasticamente a dinâmica das interações celulares e causa um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Diante do exposto, acreditamos que a investigação dos efeitos do transplante sobre o sistema de citocinas em pacientes com MM poderá revelar elementos importantes para melhor compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos e para o eventual desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Tem-se, como objetivos, avaliar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias GM-CSF, IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, INF-gamma, Klotho e TNF-alpha em amostras de 30 pacientes com MM tratados com o TCTH – autólogo. Em relação aos materiais e métodos, amostras de sangue periférico foram colhidas nas fases pré-transplante (24 horas antes e após a aférese), na fase intratransplante caracterizada pela aplasia medular decorrente da quimioterapia em altas doses e após a recuperação medular. O método ELISA foi realizado para quantificação dos níveis séricos das citocinas. Como resultados verificou-se que os níveis de IL-1ra aumentaram significativamente após a sessão de aférese ($p=0,0001$) e diminuíram nas fases de aplasia pós-condicionamento e recuperação medular a valores semelhantes aos observados na fase pré-aférese. Houve um aumento significativo dos níveis de IL-5 ($p=0,0003$) e IL-8 ($p<0,0001$) no período de aplasia pós-condicionamento, contudo diminuíram na recuperação medular. Ademais, observou-se aumento significativo dos níveis de IL-10 ($p<0,0001$) e IL-12 ($p=0,0001$) no período de recuperação medular. Esses achados não foram associados à resposta ao tratamento pré transplante ($p=0,8756$) ou correlacionados com a quantidade de células CD34+ transplantadas (CD34+ e IL-5 $p=0,9622$, CD34+ e IL-8 $p=0,7930$, CD34+ e IL-10 $p=0,6254$, CD34+ e IL12 $p=0,3607$). Entretanto, o aumento da IL-8 associou-se significativamente à positividade de hemoculturas (IL-8 $p=0,021$, risco relativo=3,68, intervalo de confiança de 95%=1,05 a 12,90). Assim, observou-se potencial associação entre o aumento da IL-12 na recuperação medular e a pesquisa de doença residual mínima (DRM) após o TCTH – autólogo. Em pacientes com DRM positiva, a média das concentrações séricas de IL-12 foi significativamente menor ($p=0,001$) e as porcentagens de plasmócitos clonais na medula óssea foram inversamente proporcionais às concentrações da IL-12 ($r=-0,845$, $p=0,0001$). Portanto, o presente estudo sugere que, em pacientes com MM, citocinas com variados níveis de expressão podem ser encontradas nas diferentes fases do TCTH – autólogo. Os níveis de IL-1ra tendem a aumentar no período pós-aférese, sugerindo um papel anti-inflamatório induzido pelo processo de aférese. A resposta caracterizada pelo aumento das concentrações de IL-5 e IL-8 no período de aplasia medular pós-condicionamento parece exercer efeito contra

infecções. O aumento dos níveis de IL-10 e IL-12 sugere possível efeito regulatório da resposta inflamatória no período de recuperação medular e a IL-12 parece associar-se inversamente com a presença de doença residual mínima.

Descritores: Mieloma múltiplo; Aferese; Quimioterapia; Medula óssea; Transplante de células-tronco; Citocinas.

ABSTRACT

Callera AF. *Evaluation of cytokine profile in the different phases of the autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: the autologous haematopoietic stem cell transplantation (autologous – HSCT) is of fundamental importance in the treatment of patients with multiple myeloma (MM). Nevertheless, due to its toxicity, it decreases the number of bone marrow cells available, drastically alters the cell interaction dynamics and causes an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines. In view of this, we believe that the investigation into the effects of the transplantation on the cytokine system in patients with MM can reveal important elements for better the comprehension of the physiopathological processes involved and for the eventual development of new therapeutic strategies. **Objectives:** evaluate the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines GM-CSF, IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, INF-gamma, Klotho and TNF-alpha in samples of 30 patients with MM treated with autologous – HSCT. **Materials and methods:** peripheral blood samples were collected in the pre-transplant phases (24 hours before and after apheresis), in the intra-transplant phase characterized by bone marrow aplasia as a result of high-dose chemotherapy and after bone marrow recovery. The ELISA method was carried out for the quantification of cytokine serum levels.

Results: IL-1ra levels increased significantly after the apheresis session ($p=0,0001$) and decreased in the phases of post-conditioning aplasia and bone marrow recovery to similar values to the observed in the pre-apheresis phase. There was a significant increase in the levels of IL-5 ($p=0,0003$) and IL-8 ($p<0.0001$) in the post-conditioning aplasia period; however, they decreased in the bone marrow recovery. We observed a significant increase in the levels of IL-10 ($p=<0,0001$) and IL-12 ($p=0,0001$) in the period of bone marrow recovery. These findings were not associated with the response to the pre-transplant treatment ($p=0,8756$) nor correlated with the number of CD34+ cells transplanted (CD34+ and IL-5 $p=0,9622$, CD34+ and IL-8 $p=0,7930$, CD34+ and IL-10 $p=0,6254$, CD34+ and IL12 $p=0,3607$). Nevertheless, the increase in IL-8 was significantly associated with the positivity of blood cultures (IL-8 $p=0,021$, relative risk=3,68, confidence interval of 95%=1,05 to 12,90). We observed a potential association between the increase in IL-12 in the bone marrow recovery and the research on minimal residual disease (MRD) after autologous – HSCT. In patients with positive MRD, the average of serum concentrations of IL-12 was significantly lower ($p=0,001$) and the percentages of clonal bone marrow plasma cells were inversely proportional to the concentrations of IL-12 ($r=-0,845$, $p=0,0001$). **Conclusion:** the present study suggests that, in patients with MM, cytokines with varied expression levels can be found in the different phases of autologous – HSCT. The levels of IL-1ra tend to increase in the post-apheresis period suggesting an anti-inflammatory role induced by the apheresis process. The response characterized by the increase in the concentrations of IL-5 and IL-8 in the period of post-conditioning bone marrow aplasia seems to have an effect

against infections. The increase in the levels of IL-10 and IL-12p70 suggests possible regulatory effect of the inflammatory response in the period of bone marrow recovery and IL-12 seems to be inversely associated with the presence of minimal residual disease.

Descriptors: Multiple myeloma; Aferese; Drug therapy; Stem Cell Transplantation; Cytokines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases do TCTH – autólogo.....	35
Tabela 2. Protocolo de mobilização de células-tronco hematopoéticas....	36
Tabela 3. Características dos pacientes com MM.....	42
Tabela 4. Eventos adversos observados durante o protocolo de mobilização de células-tronco.....	43
Tabela 5. Valores hematimétricos pré e pós-aférese.....	44
Tabela 6. Parâmetros utilizados na sessão de aférese e características do produto obtido.....	44
Tabela 7. Principais eventos clínicos e laboratoriais no período de aplasia medular pós-condicionamento.....	45
Tabela 8. Valores hematimétricos na recuperação medular (D+12).....	46
Tabela 9. Comparação entre as concentrações séricas das citocinas avaliadas nas fases pré-mobilização e pré-aférese do TCTH – autólogo. Dados expressos como média e erro padrão da média.....	51
Tabela 10. Comparação entre as concentrações séricas das citocinas avaliadas nas diferentes fases do TCTH – autólogo. Dados expressos como média e erro padrão da média.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Variação dos níveis séricos de IL-1ra.....	47
Gráfico 2. Variação dos níveis séricos de IL-5.....	48
Gráfico 3. Variação dos níveis séricos de IL-8.....	48
Gráfico 4. Variação dos níveis séricos de IL-10.....	48
Gráfico 5. Variação dos níveis séricos de IL-12.....	49
Gráfico 6. Correlação entre IL-10 e plasmócitos clonais na medula óssea.....	49
Gráfico 7. Concentração sérica da IL-12 conforme a pesquisa de doença residual mínima (DRM).....	50
Gráfico 8. Correlação entre IL-12 e plasmócitos clonais na medula óssea.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD-A	Adenina Citrato e Dextrose – Fórmula A
ACS	American Cancer Society
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD34	Células que expressam em sua superfície a molécula CD34
CFU	<i>Colony-Forming Units</i> – Unidades formadoras de colônias
CFU-GM	<i>Colony-Forming Units – Granulocytes-Monocytes</i> – Unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CVC	Cateter venoso Central
DRM	Doença residual mínima
EUA	Estados Unidos da América
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> – Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor</i> – Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional de Pesquisa sobre câncer
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma Não Hodgkin
MM	Mieloma Múltiplo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de Células-tronco Hematopoéticas
Th	Linfócitos T <i>Helper</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Celsius
Kg	quilograma
L	litro
m²	metro quadrado
μL	microlitro
mL	mililitro
mm³	milímetro cúbico
nm	nanômetro
pg	picogramas
>	maior
<	menor
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Câncer	16
2.2 Neoplasias Hematológicas	18
2.3 Mieloma Múltiplo (MM)	18
2.3.1 Manifestações clínicas	19
2.3.2 Diagnóstico	20
2.3.3 Aspectos laboratoriais	20
2.3.4 Tratamento do MM	21
2.4 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TCTH – autólogo)	22
2.4.1 Mobilização de células CD34+	24
2.4.2 Coleta de células CD34+.....	25
2.4.3 Aplasia medular após o condicionamento	27
2.4.4 Recuperação Medular	27
2.5. CITOCINAS	27
2.5.1 Aspectos gerais da ativação imunológica mediada por Interleucinas	29
2.5.2 Diferenciação para Th1	29
2.5.3 Diferenciação para Th2	30
2.5.4 Diferenciação para Th17	30
2.6. Racional para pesquisa de citocinas em TCTH	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 PACIENTES E MÉTODOS	34

4.1. Pacientes	34
4.1.1 Critérios de inclusão.....	34
4.1.2 Critérios de exclusão.....	35
4.2 Fases do TCTH – autólogo	35
4.3 Fase de mobilização das células CD34+	35
4.4 Quantificação de células CD34+	36
4.5 Coleta de células por aférese	37
4.6 Criopreservação celular	37
4.7 Protocolos TCTH – autólogo.....	38
4.8 Coleta de amostras e determinação do perfil de citocinas nas diferentes fases do TCTH – autólogo.....	38
4.9 Pesquisa de Doença Residual Mínima (DRM)	39
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
6 RESULTADOS	42
7 DISCUSSÃO.....	53
8 CONCLUSÃO.....	60
9 ASPECTOS ÉTICOS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	73

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo é uma neoplasia hematológica maligna caracterizada pela proliferação de células plasmáticas clonais na medula óssea. Apesar do avanço nas terapias atuais, incluindo quimioterapias e imunoterapias, o MM ainda é considerado uma doença incurável, com baixas taxas de sobrevida livre de eventos e sobrevida geral.

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas é de fundamental importância no tratamento de pacientes com MM e resulta em maiores taxas de doença residual mínima negativa, melhores taxas de remissão e de sobrevida dos pacientes (HAROUSSEAU; MOREAU, 2009). Entretanto, em função de sua toxicidade, diminui o número de células medulares disponíveis, altera drasticamente a dinâmica das interações celulares e pode causar um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Diante do exposto, acreditamos que a investigação dos efeitos do transplante sobre o sistema de citocinas em pacientes com MM poderá revelar elementos importantes para melhor compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos e para o eventual desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é caracterizado por um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, as quais podem espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Essas células tendem a se manifestar agressiva e incontrolavelmente, além de dividir-se rapidamente, formando tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (SEYFRIED et al., 2014).

A origem do câncer se dá por alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA) dos genes de uma célula normal que passa a receber instruções erradas para as suas atividades. Esse processo, denominado mutação genética, pode ocorrer em genes especiais (proto-oncogenes), que, a princípio, são inativos em células normais. Após ativados, os proto-oncogenes ativam-se em oncogenes e são os responsáveis pela transformação clonal das células normais (INCA, 2016).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas, internas ao organismo ou então inter-relacionadas. Dentre as causas externas, estão o meio ambiente, os hábitos próprios e culturais de uma sociedade. As causas internas que estão geneticamente pré-determinadas relacionam-se à capacidade de defesa do organismo às agressões externas (ACS, 2016; INCA, 2016; SEYFRIED et al., 2014).

De acordo com o INCA, entre todos os casos registrados, de 80% a 90% dos cânceres estão associados aos fatores ambientais, como tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, medicamentos, radiação solar e ocupacionais. Dentre todos esses fatores, alguns são mais evidentes, como, por exemplo, o cigarro, que pode causar câncer de pulmão; a exposição excessiva ao sol, que pode causar câncer de pele; e alguns vírus que podem causar leucemia.

Muitos fatores são ainda completamente desconhecidos e outros ainda estão em estudo, como, por exemplo, determinados componentes dos alimentos que ingerimos. É importante ressaltar que as mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida podem determinar diferentes tipos de câncer (BERRINO, 2014; INCA, 2016). Ademais, o surgimento do câncer pode estar relacionado a fatores pessoais, genéticos e ambientais. A mutação genética, por exemplo, pode ter origem em exposições repetidas do organismo humano por meio da inalação, ingestão ou contato pela pele aos diferentes agentes físicos, químicos ou biológicos. O estilo de vida caracterizado por uma má alimentação, sono irregular, frequentes tensões emocionais, traumas ou episódios profundos e prolongados de depressão também podem contribuir para que fatores de risco causem uma mutação maligna em algum órgão (BERRINO, 2014; RODIN et al., 2007).

Alguns indivíduos apresentam uma predisposição genética para o desenvolvimento de algum tipo de câncer, independentemente do ambiente. Entretanto, são raros os casos de câncer ligados exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Adicionalmente, indivíduos que herdaram um gene mutado podem não desenvolver a doença, em razão de medidas preventivas eficazes (INCA, 2016; PONDER, 2001).

Outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer é o envelhecimento, o qual promove mudanças nas células, aumentando a sua suscetibilidade à transformação maligna. O fato de as células dos idosos terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco explica parcialmente a razão de o câncer ser mais frequentemente diagnosticado nesses indivíduos (KRTOLICA; CAMPISI, 2002).

A Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer (IARC) reforçou, com base nos dados do *World Cancer Report* de 2014, que o câncer é um problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. A estimativa mundial realizada pelo projeto GLOBOCAN/IARC, em 2012, mostrou que, dos 14 milhões de casos novos estimados (exceto câncer de pele não melanoma), mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Em relação à mortalidade, a situação agrava-se

quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países.

2.2 Neoplasias Hematológicas

Conforme descrito na literatura científica, as neoplasias hematológicas são originárias das células do sistema hematopoético e são habitualmente conhecidas como leucemias, mielodisplasias, mieloma múltiplo e linfomas (HOFFBRAND, 2008). Apesar da baixa incidência, algumas dessas doenças exigem tratamentos permanentes, dispendiosos, e outras são potencialmente letais, influenciando diretamente nas taxas mundiais de morbidade e mortalidade.

2.3 Mieloma Múltiplo (MM)

Dentre as neoplasias onco-hematológicas, o MM é a segunda mais frequentemente diagnosticada, perdendo apenas para os linfomas, e representa 1% de todos os novos casos de câncer de todo o mundo (IARC, 2016). O MM representa de 10% a 15% das doenças onco-hematológicas e é caracterizado pela proliferação de células plasmáticas clonais na medula óssea. O dado mais recente da IARC, de 2018, revelou população estimada de 68.821 pessoas com MM nos EUA, com aproximadamente 13.648 mortes no mesmo período. Estudos apontam que a incidência dessa patologia aumentou de 4.9 para 7.5 casos/100.000 habitantes/ano em relação a 1975. Ademais, ela foi duas vezes maior em negros do que em brancos, maior em homens do que em mulheres e correspondeu à mortalidade de 3,3 por 100.000 habitantes/ano (HOWLADER et al., 2015; SWERDLOW et al., 2008).

No Brasil, apesar de a incidência do MM ainda ser desconhecida, uma vez que a doença não aparece nas estimativas anuais fornecidas pelo INCA,

estimam-se 30.000 pessoas em tratamento no País. Na cidade de São Paulo, no período de 1997 a 1999, a incidência do MM em mulheres foi de 3 por 100.000 habitantes; em homens, 4 por 100.000 habitantes, e representou 0,8% de todos os tumores para ambos os sexos (HUNGRIA et al., 2008; MINNICELLI et al., 2015; PARKIN et al., 2002). No Vale do Paraíba, estado de São Paulo, a taxas de incidência e prevalência do MM foram, respectivamente, de 0,7 e 5,7 por 100.000 habitantes (PARKIN et al., 2002).

Em relação à faixa etária, o mieloma múltiplo acomete principalmente idosos. No Ocidente, mais de 90% dos casos ocorrem após os 50 anos, com idade média ao diagnóstico de 70 anos. No Brasil, essa ocorrência surge mais cedo, de modo que a idade mediana dos pacientes no diagnóstico é de 60 anos (HOWLADER et al., 2015; HUNGRIA et al., 2008; SWERDLOW et al., 2008).

Devido ao envelhecimento populacional, é esperado um aumento do número de casos de MM. Como a doença permanece sem cura, são necessários novos estudos para avanço dos tratamentos e, conseqüentemente, aumento da expectativa de sobrevida dos pacientes.

2.3.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas presentes no mieloma múltiplo são consequência direta da infiltração neoplásica medular e da presença da proteína monoclonal (PM) no sangue ou na urina. A demonstração do componente monoclonal nos exames laboratoriais é condição fundamental para a definição diagnóstica. Dentre as principais consequências fisiopatológicas e características clínicas que geram o diagnóstico da doença estão a dor óssea, principalmente no dorso e tórax (associada ou não a fraturas patológicas), a fraqueza, o emagrecimento, as infecções recorrentes, a supressão da hematopoese e alteração da função renal (BRASIL, 2015; KYLE et al., 2003; SOUSA et al., 2004).

A principal característica do mieloma múltiplo é o acometimento ósseo, com lesões líticas que afetam predominantemente o esqueleto axial (crânio,

coluna e gradil costal) e as áreas proximais dos membros superiores e inferiores. Aproximadamente 80% dos pacientes, na avaliação radiológica inicial, podem apresentar lesões líticas no esqueleto (vértebras - 65%; arcos costais - 45%; crânio - 40%; ombros - 40%; pelve - 30%; ossos longos - 25%) e cerca de 10% dos portadores da doença apresentam osteopenia difusa ou osteoporose ao diagnóstico.

As lesões ósseas resultam do aumento da atividade osteoclástica (reabsorção óssea), acompanhada pela exaustão da função osteoblástica e redução da formação óssea. Além disso, são comumente diagnosticadas em radiografias, porém só aparecem quando já se perdeu acima de 30% das trabéculas ósseas (CALLANDER et al., 2001; DIMOPOULOS et al., 2009; EDELSTYN et al., 1967).

2.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da doença baseia-se nos seguintes critérios: 1) Detecção da PM no soro ou urina; 2) Infiltração medular por plasmócitos clonais ou plasmocitoma ósseo ou de partes moles; 3) Apresentação de (no mínimo) uma lesão de órgão-alvo, como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia ou doença óssea; e 4) Apresentação de, pelo menos, uma característica biológica de agressividade (infiltração plasmocitária clonal da medula óssea, duas lesões osteolíticas maiores que 5 mm em exame de ressonância magnética) (BRASIL, 2015; IMWG, 2003; SWERDLOW et al., 2008). Embora o MM ainda seja uma doença incurável, é importante destacar que os tratamentos atuais possibilitam o aumento significativo da sobrevida livre de eventos, da sobrevida geral e, principalmente, a melhora evidente da qualidade de vida dos pacientes (HUNGRIA; MAIOLINO, 2007).

2.3.3 Aspectos laboratoriais

As imunoglobulinas (Ig) são moléculas de glicoproteína produzidas pelos plasmócitos normais em resposta a um imunógeno e funcionam como anticorpos. As Ig derivam seu nome da descoberta de que elas migram com as proteínas globulares quando colocadas em um campo elétrico. As Ig podem ser divididas em cinco classes com base nas diferenças em sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas: IgG (cadeia pesada gama), IgM (cadeia pesada μ), IgA (cadeia pesada alfa), IgD (cadeia pesada delta) e IgE (cadeia pesada épsilon). Ademais, também são classificadas pelo tipo de cadeia leve que possuem, conforme a diferença na sequência de aminoácidos encontrada na região constante das cadeias leves, habitualmente denominada cadeia leve kappa ou cadeia leve lambda.

Os plasmócitos clonais, presentes em pacientes com MM, produzem moléculas de Ig monoclonais (MANGAN, 2005), que, por sua vez, não têm a funcionalidade de um anticorpo (RUDIN; THOMPSON., 1998; JÚNIOR et al., 2010). Normalmente, o MM é classificado em relação ao tipo de Ig ou cadeia leve produzida pelos plasmócitos; o tipo mais comum é o MM IgG, responsável por cerca de 50% a 60% dos casos, seguido do tipo IgA, com 21% dos casos, e dos tipos menos comuns, IgD, IgE e IgM. Embora o alto nível de PM no plasma seja característico da doença, há também o mieloma múltiplo não secretor, no qual não há produção de PM. Esse tipo de mieloma é encontrado em apenas 1% dos pacientes (DISPENZIERI; KYLE, 2005).

As células neoplásicas do MM produzem também citocinas que contribuem com o aparecimento de lesões líticas nos ossos dos pacientes acometidos com a doença. Essas lesões são produzidas por osteoclastos ativados por interleucinas liberadas pelos plasmócitos tumorais, como, por exemplo, IL-1, fator de necrose tumoral alfa, IL-5, fator de necrose tumoral beta e IL-6 (SUEMATSU et al., 1990).

2.3.4 Tratamento do MM

A utilização de diferentes classes de inibidores de proteassomas em associação com quimioterápicos e corticoides tem sido o tratamento de primeira linha em pacientes com MM. Novas combinações com anticorpos monoclonais anti-CD38, proteína de membrana específica de plasmócitos, e imunomoduladores (lenalidomida) demonstraram aumento das taxas de remissão mesmo em pacientes com critérios de mau prognóstico. Dentre essas drogas, a talidomida (RAJKUMAR et al., 2002) e o bortezomibe (RICHARDSON et al., 2005) estão disponíveis para uso no Brasil.

Os tratamentos agressivos, baseados na administração de altas doses de quimioterápicos em associação com o transplante de células-tronco hematopoéticas, aumentaram as taxas de remissão e representam atualmente excelente opção terapêutica. O transplante do tipo alogênico é geralmente indicado em pacientes mais jovens, com prognóstico desfavorável ou que recidivaram precocemente após os tratamentos iniciais (HUNGRIA; MAIOLINO., 2007). No entanto, para pacientes com boas condições clínicas, a opção mais utilizada é o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TCTH – autólogo) (ATTAL et al., 1996). Por fim, vale ressaltar a terapia de suporte que auxilia no controle das principais manifestações clínicas e que é fundamental para a qualidade de vida dos pacientes com MM, tais como bifosfonatos, usados para reduzir as complicações esqueléticas, e a eritropoetina, indicada para controlar a anemia (HUNGRIA et al., 2007).

2.4 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TCTH – autólogo)

O TCTH é um procedimento utilizado para o tratamento de neoplasias hematológicas e não hematológicas. Na última década, com o desenvolvimento tecnológico e os avanços na aplicação desse recurso terapêutico, houve importante diminuição das taxas de morbidade e mortalidade decorrentes das doenças neoplásicas (GOLDMAN et al, 1988; LJUNGMAN et al, 2010).

O TCTH pode ser denominado autólogo quando são utilizadas células-tronco do próprio paciente; singênico quando o doador de células tronco é gêmeo

idêntico do receptor; alogênico aparentado quando o doador compatível é irmão ou irmã do receptor; haploidêntico quando o doador é pai, mãe, filho ou filha do receptor; e alogênico não aparentado quando o doador compatível não tem parentesco com o receptor (APPELBAUM, 2003).

O TCTH – autólogo é uma estratégia terapêutica frequentemente empregada no tratamento de pacientes com neoplasias hematológicas. Vários estudos têm demonstrado que a utilização de altas doses de quimioterápicos possibilita melhores taxas de remissão e sobrevida livre de doença nesses pacientes. Entretanto, as altas doses de quimioterápicos causam lesões tóxicas na medula óssea, cuja função principal é a produção das células que compõem o sangue e o sistema imunológico.

Nesse contexto, os quimioterápicos agem contra as células neoplásicas, entretanto, agredem as células normais e habituais localizadas na medula óssea. Como consequência, o paciente pode apresentar acentuada anemia (diminuição dos glóbulos vermelhos), fenômenos infecciosos graves decorrentes da acentuada leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos) e sangramentos em função da plaquetopenia (diminuição do número de plaquetas). Esses efeitos tóxicos podem ser irreversíveis e potencialmente letais se permaneceram durante longos períodos.

Com o objetivo de contornar a toxicidade medular decorrente das altas doses dos quimioterápicos, as células-tronco hematopoéticas (CTH), caracteristicamente chamadas de células CD34+, são coletadas do próprio paciente antes da realização da quimioterapia utilizando-se um método denominado aférese. Após coletadas, as células CD34+ podem ser conservadas ou criopreservadas em temperaturas inferiores a 86 graus centígrados negativos em um freezer específico para armazenamento celular, garantindo sua viabilidade por até três (3) anos. Posteriormente ao período de quimioterapia, em geral vinte e quatro horas após o último dia da infusão do protocolo quimioterápico de altas doses, chamado de condicionamento, as células CD34+ são descongeladas e reinfundidas no paciente por via intravenosa. Como essas células não sofreram a ação dos quimioterápicos, rapidamente migram para a medula óssea do paciente, proliferam-se e diferenciam-se em células maduras,

resgatando a funcionalidade da medula óssea em curto período de tempo (COPELAN, 2006).

Portanto, o TCTH – autólogo possibilita que o paciente tenha o benefício da utilização das altas doses de quimioterápicos com acentuada redução dos efeitos tóxicos na medula óssea, o que favorece uma rápida readaptação das CTH em suas origens, retomando as respectivas funções em um pequeno intervalo de tempo. No Brasil, segundo as portarias do Ministério da Saúde (MS), o TCTH – autólogo pode ser realizado em pacientes com idade igual ou inferior a setenta e cinco (75) anos com diagnósticos estabelecidos de leucemia mieloide aguda, linfoma não Hodgkin (LNH), linfoma de Hodgkin (LH), MM, tumores de célula germinativa recidivado e neuroblastoma em estádios avançados.

Em recente artigo de revisão abordando as indicações dos diferentes tipos de TCTH, Copelan et al. (2006) demonstraram que mais de 30 mil transplantes autólogos são realizados anualmente no mundo e dois terços deles são indicados para pacientes com MM ou linfomas. Embora o MM seja uma doença incurável, vários estudos demonstraram que a utilização do TCTH – autólogo como parte efetiva do planejamento terapêutico resulta em maiores taxas de doença residual mínima (DRM) negativa (pesquisa da proporção de células clonais na medula óssea após o transplante), conseqüentemente de remissão e de sobrevida dos pacientes (ATTAL et al., 1996).

A realização do TCTH – autólogo é dividida em quatro fases, chamadas: 1) Mobilização de células CD34+; 2) Coleta de células CD34+; 3) Aplasia medular após o condicionamento; e, finalmente, 4) Recuperação medular.

2.4.1 Mobilização de células CD34+

Atualmente, a maioria do TCTH – autólogo é realizada com células CD34+ advindas do sangue periférico (SP). Contudo, para essa coleta ser possível, é preciso que haja mobilização de células CD34+ de sua origem, a medula óssea, para a periferia (SP), com um número mínimo de células de 2×10^6 células CD34+ por quilograma do receptor.

As estratégias clássicas de mobilização de CTH incluem a administração de fator de crescimento hematopoético *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) em combinação com quimioterapia mielossupressora. O momento de início da coleta após a mobilização é crucial para otimizar o rendimento do procedimento. Fatores preditivos sugeridos para o início do procedimento de aférese incluem a contagem de leucócitos, células mononucleares, plaquetas e células CD34+ no sangue periférico realizada pelo método de citometria de fluxo. Essa quantificação é realizada tanto na fase pré-aférese quanto na fase pós-aférese (GRATAMA; SUTHERLAND; KEENEY, 2001).

2.4.2 Coleta de células CD34+

Uma vez recrutadas da medula óssea, as células CD34+ presentes no SP são coletadas por um processo chamado aférese. O procedimento consiste na retirada do sangue total do paciente, separação deste sangue nos seus componentes por meio de um separador celular automatizado, retenção do componente desejado e retorno dos elementos remanescentes para o paciente. Os acessos venosos, necessários para a realização do procedimento de aférese, devem permitir um fluxo contínuo de sangue de 60-90mL/min. O paciente precisa apresentar pelo menos uma veia antecubital em cada braço, com diâmetro interno suficiente para acomodar uma agulha de calibre 16-18G para retirar o sangue total e uma agulha com calibre mínimo 19G para a devolução dos elementos remanescentes. Esse fluxo pode ser obtido também por acessos venosos periféricos, caso contrário pode ser alcançado por meio de um cateter venoso de duplo lúmen inserido na veia subclávia, veia jugular interna ou veia femoral.

Para adequada coleta das células CD34+, a solução de citrato dextrose (ACD-A) é utilizada para anticoagulação sanguínea nos procedimentos de aférese. Essa solução é inserida em um dispositivo conectado ao cateter venoso central antes do início do procedimento. A anticoagulação decorre da ligação do citrato ao cálcio ionizado, que resulta na diminuição temporária no nível sérico

deste íon indispensável para a coagulação. O volume de ACD-A utilizado em cada procedimento varia de 1mL de solução de ACD-A para cada 12mL a 15mL de sangue total processado. Embora parte do citrato utilizado durante a aférese retorne para o paciente, a anticoagulação sistêmica não ocorre graças à rápida metabolização hepática. Por outro lado, alguns sintomas relacionados com a hipocalcemia podem ocorrer, como parestesias, tremores, cefaleia ou náuseas.

Na maioria dos pacientes, esses sintomas são de natureza leve e melhoram com manobras simples, como a diminuição da velocidade de reinfusão do ACD-A ou com a administração intravenosa de gluconato de cálcio. Outros efeitos adversos relacionados com o procedimento de aférese incluem redução em 20-30% na contagem prévia de plaquetas, reação vaso-vagal, hipotensão arterial, síncope, insuficiência respiratória, hemólise e embolia. Mcleod et al. (1999) reportaram a incidência de 1,6% de reações adversas relacionadas com a coleta de CPH por aférese.

Habitualmente, em um período de 3-4 horas, 5-7 litros de sangue do paciente são processados pelo equipamento em cada procedimento de aférese. Embora a eficiência do procedimento de coleta esteja diretamente relacionada com o número de células CD34+ presente no sangue periférico e com o volume sanguíneo processado, coletas muito prolongadas, com processamento superior a quatro volemias, devem ser evitadas, pois oferecem maiores riscos de desenvolvimento de efeitos adversos graves relacionados ao procedimento, como hipocalcemia e plaquetopenia (COMENZO et al., 1995).

Geralmente, as contagens de células CD34+ superiores a 10 células/ μ L no SP, realizadas antes da aférese, são associadas a um bom rendimento após o procedimento. O valor mínimo deve ser de 2×10^6 células CD34+ por quilograma do receptor no produto coletado (ARMITAGE et al., 1997). Inversamente, concentrações inferiores a 10 células/ μ L são associadas a coletas ruins e à necessidade de vários procedimentos em dias consecutivos, até que o valor mínimo pré-definido seja atingido (RAMES et al., 1997; KNUDSEN et al., 1998; NOGA et al., 2001).

O objetivo das coletas por aférese é obter um produto adequado, quantitativa e qualitativamente, com poucos efeitos adversos para os pacientes e que resulte em rápida e satisfatória reconstituição da função medular.

2.4.3 Aplasia medular após o condicionamento

O condicionamento consiste na administração de altas doses de quimioterápicos antineoplásicos e tem como finalidade a destruição de células neoplásicas remanescentes. Em pacientes com MM, o protocolo de condicionamento atualmente utilizado é o melfalano na dose de 200mg por metro quadrado. O principal efeito colateral é a toxicidade das células existentes na medula óssea, resultando na fase denominada de aplasia medular (ausência temporária, numérica e funcional da medula óssea). Com o objetivo de contornar esses efeitos tóxicos, as células CD34+ são reinfundidas um dia após o término do regime ablativo de condicionamento. Geralmente, a fase de aplasia medular perdura de 3 a 10 dias após o condicionamento e pode ser definida por meio do hemograma que se apresenta com nível de hemoglobina $<10\text{g/dL}$, contagens de glóbulos brancos $<0,5 \times 10^9/\text{L}$ e, frequentemente, plaquetas $<20 \times 10^9/\text{L}$.

2.4.4 Recuperação Medular

Considerando a contagem mínima de células CD34+ infundidas após o condicionamento, bem como as condições assistenciais necessárias, a recuperação medular ocorrerá em período de 9 a 12 dias. Essa fase tem como principais características a contagem de neutrófilos $>0,5 \times 10^9/\text{L}$, de plaquetas $>20 \times 10^9/\text{L}$ e a consequente ausência de necessidade transfusional de concentrado de hemácias ou de plaquetas.

2.5. Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, com peso molecular entre 8 e 30 kDa. Habitualmente, são produzidas por células do sistema imune por meio da ativação de quinases proteicas ativadas por mitógenos. Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL), numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35, fatores de necrose tumoral (FNT), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (AKDIS et al., 2011).

Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) ou autócrino (nas próprias células produtoras). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, isto é, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas. Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência de populações celulares, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória.

Portanto, algumas citocinas podem ter ações pró-inflamatórias e outras anti-inflamatórias conforme o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, ressaltam-se as IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e FNT. As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β (TGF β). (ZHANG; NA, 2007). As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, entretanto a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir de uma determinada lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. Por sua vez,

as citocinas anti-inflamatórias podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

2.5.1 Aspectos gerais da ativação imunológica mediada por Interleucinas

As células efetoras da linhagem T CD4⁺ são caracterizadas pela sua capacidade de expressar moléculas de superfície e secretar interleucinas que ativam outras células. Enquanto as células T CD4⁺ virgens produzem IL-2 principalmente após sua ativação, as células efetoras são capazes de produzir um grande número e uma variedade de interleucinas que possuem atividades biológicas diversificadas. Existem 3 subgrupos distintos de células T CD4⁺ chamados Th1, Th2 e Th17, que funcionam na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de agentes infecciosos e estão envolvidos em tipos diferentes de lesão ao tecido nas patologias mediadas pelo sistema imune (HOFFBRAND, 2008).

As características que definem os tipos diferenciados das células efetoras dependem das interleucinas que eles produzem, dos fatores de transcrição que expressam e das alterações epigenéticas nos loci do gene da interleucina. As IL características produzidas pelos principais subtipos de célula T CD4⁺ são: interferon gama (IFN- γ) para Th1; IL-4, IL-5, IL-13 para Th2; IL-17 e IL-22 para Th17 (AKDIS et al., 2011).

2.5.2 Diferenciação para Th1

A produção de IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos em resposta aos microrganismos, incluindo os patógenos intracelulares e o IFN- γ produzido pelas células Natural Killer (NK), todos como parte da resposta imune inata inicial aos agentes infecciosos, ativa os fatores de transcrição t-bet, STAT1 e STAT4, que estimulam a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens para o subtipo Th1.

O IFN- γ produzido pelas células Th1 amplifica essa resposta e inibe o desenvolvimento das células Th2 e Th17.

2.5.3 Diferenciação para Th2

A produção de IL-4 pelas próprias células T ativadas ou pelos mastócitos e eosinófilos, particularmente em resposta aos helmintos, ativam os fatores de transcrição GATA3 e STAT6 que estimulam a diferenciação das células T CD4+ virgens para o fenótipo Th2. A produção de IL-4 pelas células Th2 amplifica essa resposta e inibe o desenvolvimento das células Th1 e Th17.

2.5.4 Diferenciação para Th17

As IL-1 e IL-6 produzidas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) e o TGF β produzido por várias células ativam os fatores de transcrição ROR γ t e STAT3, que estimulam a diferenciação das células T CD4+ virgens no subtipo Th17. A produção de IL-17 pelas células CD4+ ativadas estimulam a secreção de IL-6 e IL-8, principalmente em fibroblastos. A IL-23, também produzida pelas APC, principalmente em resposta aos fungos, estabiliza as células Th17. O TGF β pode favorecer as respostas Th17 indiretamente por suprimir as células Th1 e Th2, que inibem a diferenciação de Th17. A produção de IL-21 pelas células Th17 amplifica essa resposta (NORMATON; MARTI, 2013).

2.6 Racional para pesquisa de citocinas em TCTH

Conforme descrito anteriormente, o TCTH – autólogo é um procedimento complexo que causa grande interferência no sistema de defesa do paciente. A

quimioterapia em altas doses, em função de sua toxicidade, diminui o número de células medulares disponíveis, altera drasticamente a dinâmica das interações celulares e causa um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

O sistema de citocinas constitui-se por uma rede de interação funcional, motivo pelo qual é mais relevante investigar um conjunto de citocinas ao invés de uma em particular (BRUSERUD; KITTANG, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que o aumento transitório de citocinas inflamatórias associou-se à ocorrência de sintomas graves, como dor, fadiga e distúrbios do apetite ou sono em pacientes submetidos ao TCTH – alogênico ou tratados com quimioterapias para tumores de estômago e pulmão (WANG et al., 2008, WANG et al., 2010, WANG et al., 2012).

Em pacientes com leucemia mieloide aguda, a importância das citocinas durante as diferentes fases do tratamento quimioterápico até o TCTH baseou-se em algumas observações, como o aumento da densidade de microvasos na medula óssea infiltrada por células leucêmicas, a interação entre células leucêmicas e endoteliais mediada por citocinas, o impacto prognóstico relacionado com os níveis séricos de citocinas reguladoras da angiogênese e também o efeito inibitório de algumas citocinas sobre o crescimento de células leucêmicas (REIKVAN et al., 2012, BRUSERUD et al., 2007, KORNBLAU et al., 2010).

Em recente estudo, Reikvam e colaboradores (2012) investigaram a associação entre o perfil de citocinas no período pré-transplante alogênico de medula óssea e o risco de complicações pós-transplante. A análise dos níveis séricos de 35 citocinas possibilitou a identificação de três subgrupos distintos de pacientes, um deles com baixas taxas de rejeição tecidual e baixo risco de morte precoce relacionada ao transplante. Esses pacientes apresentaram níveis altos de fator de crescimento de granulócitos, fator de crescimento de hepatócitos, bem como baixas concentrações do receptor solúvel do fator de necrose tumoral-1. Com base nos resultados encontrados, os autores confirmaram a influência da inter-relação de citocinas na fase pré-transplante sobre alguns desfechos clínicos observados após o transplante.

Portanto, no contexto dos tratamentos quimioterápicos agressivos incluindo os TCTH, as citocinas parecem ter algum papel no controle de células tumorais, na reconstituição dos sistemas imune e hematopoético, nas complicações pós-transplante e eventualmente no risco de recaída da doença de base.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (GM-CSF, IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, INF-gamma, Klotho e TNF-alpha) em amostras de pacientes com MM obtidas das diferentes fases do TCTH – autólogo.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a existência de variações das respectivas citocinas nas fases do TCTH – autólogo;

Analisar e discutir a ocorrência de eventuais associações entre as citocinas e os fenômenos biológicos envolvidos no processo do TCTH – autólogo;

Propor novas investigações tendo como base os resultados encontrados.

4 PACIENTES E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em parceria com a unidade de transplante de medula óssea do Hospital PIO XII de São José dos Campos, instituição filantrópica privada, referência no tratamento de pacientes com doenças onco-hematológicas provenientes da Rede Regional de Atenção à Saúde XVII desde 1999.

4.1 Pacientes

No período entre agosto de 2017 a agosto de 2019, trinta (30) pacientes com o diagnóstico recente de mieloma múltiplo (MM), tratados com o transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TCTH – autólogo), foram inseridos neste estudo prospectivo (Tabela 3). Inicialmente, amostras de vinte (20) pacientes, obtidas de cada fase do transplante, foram analisadas. Posteriormente, mais dez (10) casos foram inseridos visando confirmar os resultados preliminares encontrados. Nesse grupo, avaliou-se também o período prévio à mobilização das células CD34+ com o objetivo de demonstrar eventual influência do processo de mobilização na concentração sérica das citocinas. Todos os pacientes assinaram termos de consentimento livre e esclarecido contendo informações detalhadas sobre as diferentes fases do TCTH – autólogo.

4.1.1 Critérios de inclusão

Os protocolos quimioterápicos de indução da remissão utilizados previamente ao transplante foram os seguintes: ciclofosfamida e dexametasona, ciclofosfamida e dexametasona combinados com talidomida e bortezomibe associado com ciclofosfamida e dexametasona. Somente pacientes que atingiram ao menos remissão parcial foram incluídos no estudo.

4.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes sem resposta aos tratamentos de indução da remissão, com doença cardíaca e fração de ejeção menor que 50%, com doença pulmonar ou hepática limitante, com clearance de creatinina menor que 40 ml/min, ECOG maior que 1 ou índice de Karnofsky menor que 70, coleta insuficiente de CPH ou sorologias HIV ou HCV positivas não foram elegíveis.

4.2 Fases do TCTH – autólogo

As fases do TCTH – autólogo estão apresentadas na Tabela 2. Habitualmente, o período de quimioterapia de condicionamento é caracterizado pelo sinal menos antes dos dias específicos. O momento da infusão das células CD34+ é chamado dia zero (D 0), e a evolução diária do paciente após a infusão das células CD34+ é classificada como D+1, D+2, assim sucessivamente até a recuperação medular.

Tabela 1. Fases do TCTH – autólogo.

Fase	Período (dias)
Mobilização de células CD34+	14 dias
Coleta de células CD34+ por aférese	1 ou 2 dias
Quimioterapia em altas doses (condicionamento)	2 dias (D-2 e D-1)
Descongelamento e infusão de células CD34+	1 dia (D 0)
Aplasia medular após condicionamento	9 a 12 dias (D+1 ao D+12)
Recuperação medular	A partir do D+9

4.3 Fase de mobilização das células CD34+

A mobilização das células CD34+ para o sangue periférico foi realizada duas semanas antes do transplante utilizando-se o protocolo citarabina (Ara-C) em associação com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF), conforme descrito na Tabela 3. Os pacientes foram internados no primeiro dia para infusão intravenosa de Ara-C e obtiveram alta no terceiro dia.

O G-CSF foi aplicado diariamente, por via subcutânea, em ambiente ambulatorial entre o sexto e o décimo terceiro dia. No décimo terceiro dia, os pacientes foram novamente hospitalizados para os procedimentos relacionados à coleta de células CD34+ por aférese: coleta de amostras de sangue periférico para quantificação de células CD34+, transfusão de concentrado de hemácias ou plaquetas quando necessário e implante de cateter central. Nessa fase, as transfusões de hemocomponentes foram indicadas com o objetivo de manter o nível de hemoglobina igual ou superior a 10g/dL (valor que proporciona melhor performance durante a aférese) e a contagem de plaquetas acima de $30 \times 10^9/L$ (valor associado à diminuição dos riscos de sangramento durante a implantação do cateter central). Durante todo o período de mobilização, os pacientes foram avaliados quanto às reações adversas hematológicas e não hematológicas, classificadas conforme a Critério Comum de Terminologia para eventos adversos (SAAD et al., 2002).

Tabela 2. Protocolo de mobilização de células-tronco hematopoéticas.

Dia(s)	Procedimentos
1 e 2	Ara-C 400mg/m ² , infusão intravenosa de 2 horas, de 12 em 12 horas
3	Alta hospitalar
4 e 5	-
6 a 14	G-CSF 12µg/Kg, por via subcutânea, ambiente ambulatorial
14	Aférese

4.4 Quantificação de células CD34+

A contagem de células CD34+ foi realizada quando neutrófilos $>1,0 \times 10^9/L$. Nos pacientes que não apresentaram este valor no décimo terceiro dia da mobilização, a administração do G-CSF foi mantida até atingir o objetivo previamente definido. O valor mínimo de 10 células CD34+ por microlitro (μL) foi estabelecido para o início da aférese; naqueles que não apresentaram este valor no décimo terceiro dia da mobilização, a administração do G-CSF foi mantida até atingir o valor mínimo previamente definido. As células CD34+ foram quantificadas de acordo com os protocolos descritos pela International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (GRATAMA et al., 2001).

4.5 Coleta de células por aférese

Os pacientes que atingiram os critérios estabelecidos no décimo terceiro dia da mobilização foram liberados para a realização da aférese (décimo quarto dia). As células-tronco hematopoéticas mobilizadas da medula óssea para o sangue periférico foram coletadas por um aparelho separador de células de fluxo intermitente (Haemonetics MCS+ 9000E, Haemonetics Corporation, Massachusetts, EUA), conforme os protocolos definidos pelo fabricante para coleta de células mononucleares do sangue periférico. O objetivo nessa fase foi atingir $5,0 \times 10^6$ células CD34+/kg do paciente no produto final da aférese.

4.6 Criopreservação celular

Após realização do procedimento de aférese, parte do produto foi mantido entre $2^{\circ}C$ e $6^{\circ}C$ e devolvido para o paciente após a quimioterapia em altas doses. A outra parte foi congelada usando-se uma mistura crioprotetora contendo dimetilsulfóxido, hidroxietilamido e albumina humana. As bolsas contendo as células foram criopreservadas em freezers com temperaturas inferiores a $84^{\circ}C$ negativos.

4.7 Protocolos TCTH – autólogo

Para a realização do TCTH – autólogo, os pacientes foram internados em quartos individuais com filtros HEPA (*high-efficiency particulate arrestance*). O condicionamento (quimioterapia em altas doses) utilizado em todos os pacientes foi melfalano na dose de 200mg/m². Um dia após o final do condicionamento, as células CD34+ a fresco ou criopreservadas foram descongeladas em banho-maria e imediatamente infundidas nos pacientes.

Os protocolos clínicos após o transplante envolveram a utilização de cuidados específicos, como administração de antimicrobianos profiláticos (aciclovir e fluconazol), transfusão de hemocomponentes quando necessário, tratamento antimicrobiano empírico para neutropenia febril, coleta de hemoculturas, tratamento de mucosites e nutrição parenteral quando baixa ingestão calórica por via oral.

O período de toxicidade medular decorrente do condicionamento, aplasia medular pós-quimioterapia, foi definido pela contagem de neutrófilos abaixo de 0,5x10⁹/L e pela recorrente necessidade transfusional de concentrado de hemácias e plaquetas. A recuperação medular foi caracterizada quando houve neutrófilos acima de 0,5x10⁹/L e plaquetas acima de 20x10⁹/L sem necessidade transfusional.

4.8 Coleta de amostras e determinação do perfil de citocinas nas diferentes fases do TCTH – autólogo

Amostras de sangue periférico de cada paciente foram coletadas antes da mobilização de células CD34+, antes e após a sessão de aférese (um dia antes e um dia após) no período de aplasia medular (no D+7) e após a recuperação medular (no D+12) para avaliação dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias GM-CSF, IL-1ra, IL1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-

8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, INF-gamma (γ), Klotho e TNF-alpha (α). O sangue foi coletado por punção venosa utilizando-se material estéril e tubos a vácuo contendo EDTA K3 (dois tubos de 5mL).

Após a coleta do sangue, os dois tubos foram centrifugados a 900g, por 7 minutos, a 4°C. O plasma obtido foi armazenado em temperaturas inferiores a -84°C para posterior avaliação, utilizando-se kits Duo Set® (R&D Systems, MN, EUA) conforme recomendação dos fabricantes. A leitura da absorbância foi realizada em multileitor Spectra Max i3 (Molecular Devices, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm, conforme especificação do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/ml.

4.9 Pesquisa de Doença Residual Mínima (DRM)

A avaliação da resposta ao tratamento por meio da pesquisa da DRM é prática habitual nos serviços de transplante de medula óssea. Amostras de sangue medular obtidas por mielograma foram colhidas dos pacientes entre 90 e 100 dias após o TCTH – autólogo. A pesquisa de plasmócitos clonais no material obtido (DRM) foi realizada por citometria de fluxo. Resumidamente, um painel de seis cores foi usado contendo os seguintes anticorpos monoclonais: CD138 APC (B-B4; Miltenyi Biotec); CD45 APC-Cy7 (2D1; BD Pharmingen, Oxford, United Kingdom); CD38 PE-Cy7 (HIT2; BD Pharmingen); e CD19 PerCP-Cy5.5 (HIB19; BD Pharmingen).

Em todos os casos, foi analisada a expressão do CD56 PE (MY31; BD Biosciences) e do CD27 FITC (M-T271; BD Pharmingen) na janela de plasmócitos. A presença de DRM foi definida quando detectada população fenotipicamente aberrante de plasmócitos maior ou igual a 50 em 500.000 eventos (0,01%). A ausência da expressão do CD19, a forte expressão do CD56, as fracas expressões do CD27 e/ou do CD45 caracterizaram a população aberrante. Pacientes com expressão aberrante menor que 20 em 500.000 eventos foram classificados como DRM negativa. Nos casos entre 20 e 50 eventos ou diante da detecção de pequenas populações celulares com fenótipo

duvidoso, a classificação foi realizada por meio da aquisição de maior número de eventos ou da análise adicional dos marcadores CD81 FITC (JS-81; BD Pharmingen), CD117 PE (YB5.B8; BD Pharmingen), CD200 PE (MRC OX-104; BD Pharmingen) e/ou CD52 FITC (HI186; AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom). (RAWSTRON et al., 2013).

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se amostras não paramétricas e pareadas. As variáveis categóricas foram testadas com teste exato de Fischer. As análises de variância das amostras foram realizadas com o teste de Friedman (*One Way ANOVA*), e as correlações entre variáveis com o teste de Spearman.

A comparação entre os períodos pré-mobilização e pré-aférese foi realizada com o teste de Mann Whitney, considerando-se, nessa situação, amostras não paramétricas e não pareadas. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância estatística. Os dados foram analisados com o *software GraphPad Prism 6*.

6 RESULTADOS

Conforme demonstrado na Tabela 3, 70% dos pacientes foram tratados com apenas um protocolo quimioterápico e 60% estavam em resposta parcial do MM no momento do transplante. Em 4 pacientes (20%)houve necessidade de associar radioterapia ao protocolo inicial.

Tabela 3. Características dos pacientes com MM.

Mediana das idades (mínimo - máximo)	61 (40 - 70)
Masculino / Feminino (%)	19 (63) / 11 (37)
Mediana dos pesos (mínimo - máximo)	70 (57 - 108)
Classificação diagnóstica	n (%)
Imunoglobulina G	18 (60)
Imunoglobulina A	7 (23)
Cadeia leve de Imunoglobulina	5 (17)
Estadiamento ISS (<i>International Staging System</i>)	
ISS I	16 (53)
ISS II	9 (30)
ISS III	5 (17)
Tratamentos de indução da remissão	
Único protocolo quimioterápico	18 (60)
Dois protocolos quimioterápicos	8 (27)
Radioterapia associada	4 (13)
Resposta terapêutica pré-transplante	
Resposta completa (RC)	04 (13)
Resposta parcial muito boa (RPMB)	06 (20)
Resposta parcial (RP)	20 (67)

ISS I = beta2-microglobulina sérica < 3,5mg/L e albumina sérica ≥ 3,5g/DL, **ISS II** = intermediário entre I e III, **ISS III** = beta2-microglobulina sérica ≥ 5,5mg/L. Resposta Completa (**RC**) = imunofixação negativa (soro e urina), plasmócitos clonais na medula óssea ≤ 5%, desaparecimento de plasmocitoma extraósseo e nenhum aumento no tamanho ou número de lesões líticas. Resposta Parcial Muito Boa (**RPMB**) = proteína monoclonal detectável por imunofixação, mas não por eletroforese, redução da proteína monoclonal no soro ou urina ≥ 90% e proteinúria < 100mg/24h. Resposta Parcial (**RP**): redução da proteína monoclonal no soro ≥ 50%, na urina ≥ 90% e proteinúria < 200mg/24h.

Os pacientes não apresentaram reações adversas nos dias 1 e 2 do protocolo de mobilização. O período ambulatorial entre o sexto e o décimo terceiro dia do protocolo não proporcionou efeitos adversos nos pacientes. Durante todo o estudo, dois pacientes necessitaram internação devido ao fato de residirem muito longe do hospital. Ademais, nenhum paciente apresentou neutropenia febril (Tabela 4).

O protocolo de mobilização foi efetivo, proporcionando valores maiores que 10 células CD34+/ μ L em todos os pacientes; a mediana foi de 75 células CD34+/ μ L (17 – 778/ μ L).

Tabela 4. Eventos adversos observados durante o protocolo de mobilização de células tronco.

Hematológicos	n (%)
Neutropenia	
Grau 1	24 (80)
Grau 2	4 (13)
Grau 3	2 (7)
Grau 4	0
Trombocitopenia	
Grau 1	0
Grau 2	20 (67)
Grau 3	8 (27)
Grau 4	2 (6)
Transfusões	
Concentrado de Hemácias	8 (27)
Concentrado de Plaquetas	11 (37)
Não hematológicos	
Dor óssea decorrente do G-CSF	5 (17)
Fraqueza	3(10)
Alergia	1 (3)
Diarreia	1 (3)
Dispepsia	1 (6)

Elevação da creatinina*

1 (3)

Neutropenia grau 0: sem alterações, **grau 1:** $\geq 1,5$ a $< 2,0 \times 10^9/L$, **grau 2:** $\geq 1,0$ a $< 1,5 \times 10^9/L$, **grau 3:** $\geq 0,5$ a $< 1,0 \times 10^9/L$ e **grau 4:** $< 0,5 \times 10^9/L$. **Trombocitopenia grau 0:** sem alterações, **grau 1:** 150 a $75 \times 10^9/L$, **grau 2:** ≥ 50 a $< 75 \times 10^9/L$, **grau 3:** ≥ 10 a $< 50 \times 10^9/L$ e **grau 4:** $< 10 \times 10^9/L$. *Variação de 1,3 a 1,5mg/dL.

Uma única sessão de aférese foi suficiente para coletar o objetivo desejado (maior que $5,0 \times 10^6$ células CD34+/kg) em 90% dos pacientes. Não houve diferenças significativas entre os diferentes elementos celulares encontrados antes e após a sessão de aférese; a mediana encontrada foi de $8,3 \times 10^6$ células CD34+/kg (Tabelas 5 e 6, respectivamente).

Tabela 5. Valores hematimétricos pré e pós-aférese.

	Pré-aférese	Pós-aférese*
Hemoglobina (g/dL)	9,4 (8,1 – 12,0)	9,5 (8,1 - 11,4)
Hematócrito (%)	28,6 (22,6 - 34,6)	29,1 (24 - 34,7)
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	19,6 (9,8 - 56,4)	18,3 (8,9 - 45,7)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	17,0 (7,1 - 45,2)	13,3 (7,0 - 29,6)
Linfócitos ($\times 10^9/L$)	1,7 (0,6 - 5,7)	1,5 (0,6 - 4,9)
Monócitos ($\times 10^9/L$)	0,7 (0,1 - 2,8)	0,8 (0,2 – 2,1)
Células imaturas ($\times 10^9/L$)	2,3 (0,9 – 6,6)	1,4 (0,3 - 4,4)
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	84 (27 - 282)	95 (45 - 260)

Valores apresentados como mediana (mínimo - máximo). *Ausência de diferenças significativas entre pré e pós-aférese.

Tabela 6. Parâmetros utilizados na sessão de aférese e características do produto obtido.

Volume processado (mL)	7560 (4318 - 10119)
ACD-A (mL)	792 (514 - 1019)
Tempo (minutos)	259 (184 - 352)
Produto obtido	
Volume (mL)	161 (117 - 207)
Leucócitos ($\times 10^6/mL$)	363,1 (114,1 – 698,4)
Viabilidade celular (%)	94 (83 - 99)
CD34+ ($\times 10^6/kg$)	8,7 (4,1 – 38,7)

Valores apresentados como mediana (mínimo - máximo).

Todos os pacientes receberam a quimioterapia de condicionamento imediatamente após o protocolo de mobilização. Os protocolos clínicos de suporte foram administrados após infusão das células CD34+. Além disso, todos os pacientes receberam profilaxias para vírus e fungos com aciclovir e fluconazol respectivamente. No período de aplasia medular pós-condicionamento, todos os pacientes apresentaram neutropenia febril com indicação de tratamento antimicrobiano empírico; amostras de hemocultura foram positivas em dezesseis pacientes (53%), e todos necessitaram de transfusão de hemocomponentes (Tabela 7).

Tabela 7. Principais eventos clínicos e laboratoriais no período de aplasia medular pós-condicionamento.

Valores hematimétricos	Mediana (mínimo - máximo)
Hemoglobina (g/dL)	7,2 (6,5 - 7,9)
Hematócrito (%)	21,3 (19,1 - 27,6)
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	0,1 (0,04 - 0,1)
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	0
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	0
Monócitos (x10 ⁹ /L)	0
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	19 (3 - 55)
Hemocomponentes utilizados	
Concentrado de hemácias	2 (0 - 4)
Concentrado de plaquetas	14 (7 - 35)
Hemoculturas positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7 (23)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (10)
<i>Escherichia coli</i>	5 (17)
<i>Morganella morganii</i>	1 (3)
Antimicrobianos	
Cefepime isoladamente	4 (13)
Cefepime associado com vancomicina	21 (70)

Substituição do cefepime por meropenem	5 (17)
Lesão do trato digestório	
Diarreia	5 (17)
Mucosite	8 (27)
Grau 1	0
Grau 2	5 (17)
Grau 3	22 (73)
Grau 4	3 (10)
Nutrição parenteral	4 (13)

Mucosite grau 0: sem alterações, **grau 1:** úlceras indolores, eritema ou irritabilidade leve na ausência de lesões, **grau 2:** eritema doloroso, edema ou úlceras, mas consegue comer e deglutir, **grau 3:** eritema doloroso, edema ou úlceras que requerem hidratação intravenosa, **grau 4:** úlceras graves que requerem suporte nutricional enteral ou parenteral ou intubação profilática.

Não houve falhas de recuperação medular. As medianas dos tempos para neutrófilos $>0.5 \times 10^9/L$ e para plaquetas $>20 \times 10^9/L$ foram 10 dias (9 – 12 dias) e 11 dias (9 – 13 dias), respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Valores hematimétricos na recuperação medular (D+12).

Valores hematimétricos	Mediana (mínimo - máximo)
Hemoglobina (g/dL)	8,4 (7,5 - 8,9)
Hematócrito (%)	24,1 (21,7 - 27,4)
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	3,2 (1,2 - 10,5)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	2,3 (0,7 - 5,9)
Linfócitos ($\times 10^9/L$)	0,3 (0,04 – 2,1)
Monócitos ($\times 10^9/L$)	0,2 (0,09 - 0,6)
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	29 (23 - 97)

As concentrações de citocinas não sofreram interferência do processo de mobilização (Tabela 9). Os níveis de IL-1ra aumentaram significativamente após a sessão de aférese ($p=0,0001$) e diminuíram nas fases de aplasia pós-condicionamento e recuperação medular a valores semelhantes aos observados na fase pré-aférese.

Houve aumento significativo dos níveis de IL-5 ($p=0,0003$) e IL-8 ($p<0,0001$) no período de aplasia pós-condicionamento, contudo diminuíram na

recuperação medular. Observou-se aumento dos níveis de IL-10 ($p < 0,0001$) e IL-12 ($p = 0,0001$) no período de recuperação medular (Gráficos 1, 2, 3, 4 e 5). Estes achados não foram associados com a resposta ao tratamento pré transplante ($p = 0,8376$) ou correlacionados com a quantidade de células CD34+ transplantadas (CD34+ e IL-5 $p = 0,9438$, CD34+ e IL-8 $p = 0,7592$, CD34+ e IL-10 $p = 0,6449$, CD34+ e IL12 $p = 0,3378$), entretanto o aumento da IL-8 associou-se significativamente com a positividade de hemoculturas (IL-8 $p = 0,030$, risco relativo=4,56, intervalo de confiança de 95%=0,72 a 28,73). Ademais, não houve associação entre IL-5 e hemoculturas positivas ($p = 0,06$). Finalmente, não foram demonstradas variações das concentrações séricas das citocinas GM-CSF, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-17, INF-gamma, Klotho e TNF-alpha nas diferentes fases do TCTH – autólogo (Tabela 10).

Observou-se potencial associação entre o aumento da IL-12 na recuperação medular e a pesquisa de DRM após o TCTH – autólogo. Em pacientes com DRM positiva, a média das concentrações séricas de IL-12 foi significativamente menor ($p = 0,001$), e as porcentagens de plasmócitos clonais na medula óssea foram inversamente proporcionais às concentrações da IL-12 ($r = -0,845$, $p = 0,0001$). Essas associações não foram demonstradas após comparações com IL-10 (Gráficos 6, 7 e 8).

Gráfico 1. Variação dos níveis séricos de IL-1ra (média e erro padrão da média) nas fases do TCTH – autólogo.

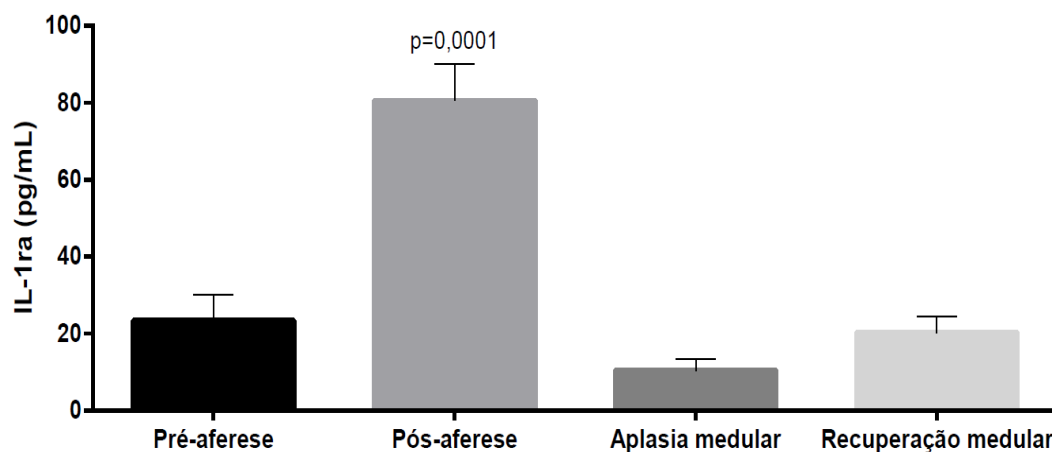


Gráfico 2. Variação dos níveis séricos de IL-5 (média e erro padrão da média) nas fases do TCTH – autólogo.

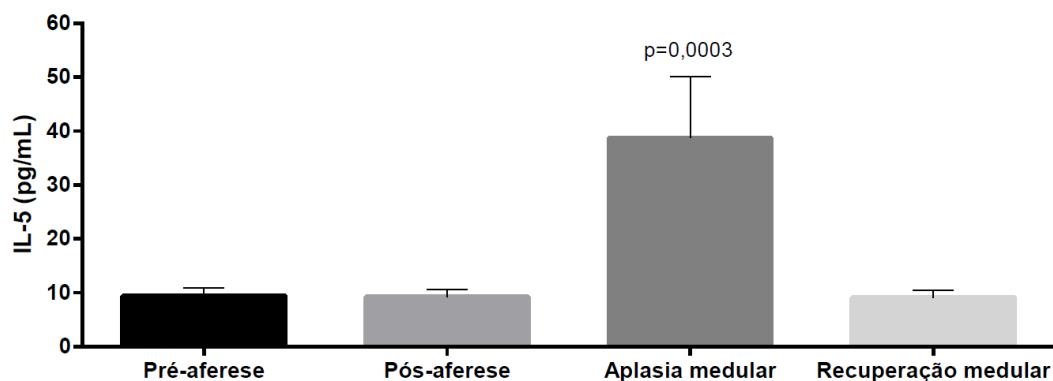


Gráfico 3. Variação dos níveis séricos de IL-8 (média e erro padrão da média) nas fases do TCTH – autólogo.

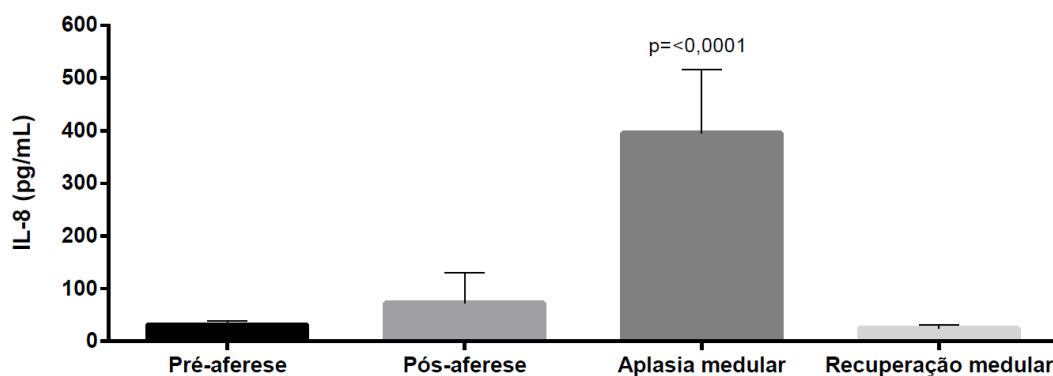


Gráfico 4. Variação dos níveis séricos de IL-10 (média e erro padrão da média) nas fases do TCTH – autólogo.

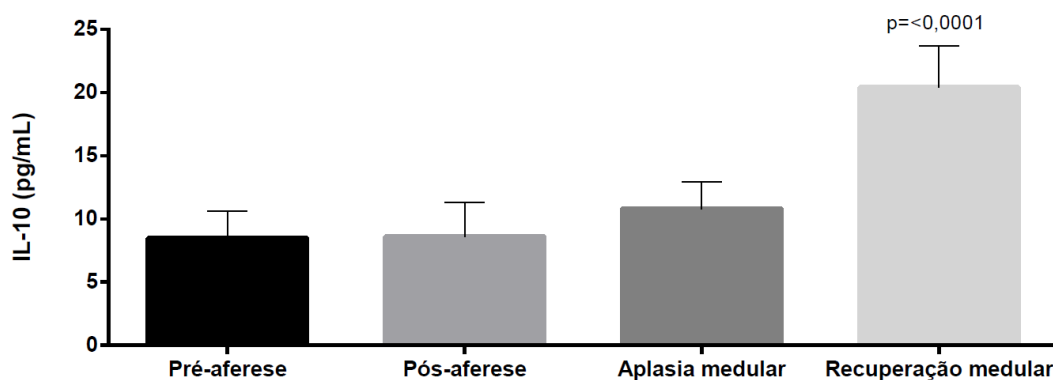


Gráfico 5. Variação dos níveis séricos de IL-12 (média e erro padrão da média) nas fases do TCTH – autólogo.

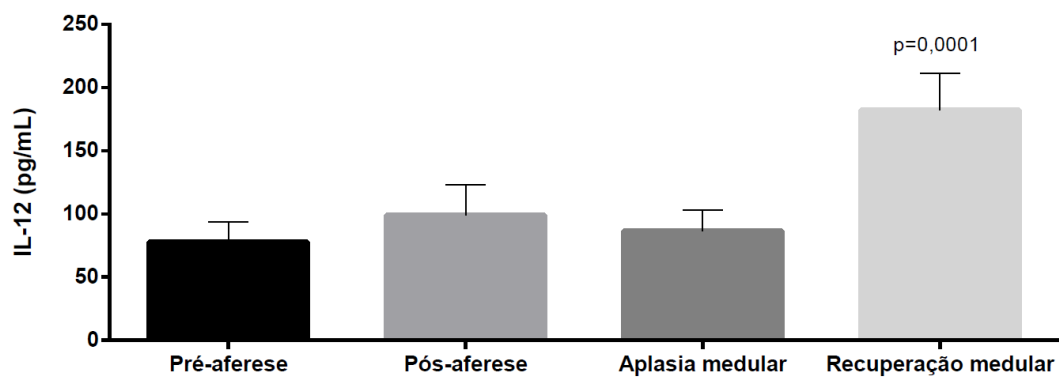


Gráfico 6. Correlação entre IL-10 e plasmócitos clonais na medula óssea.

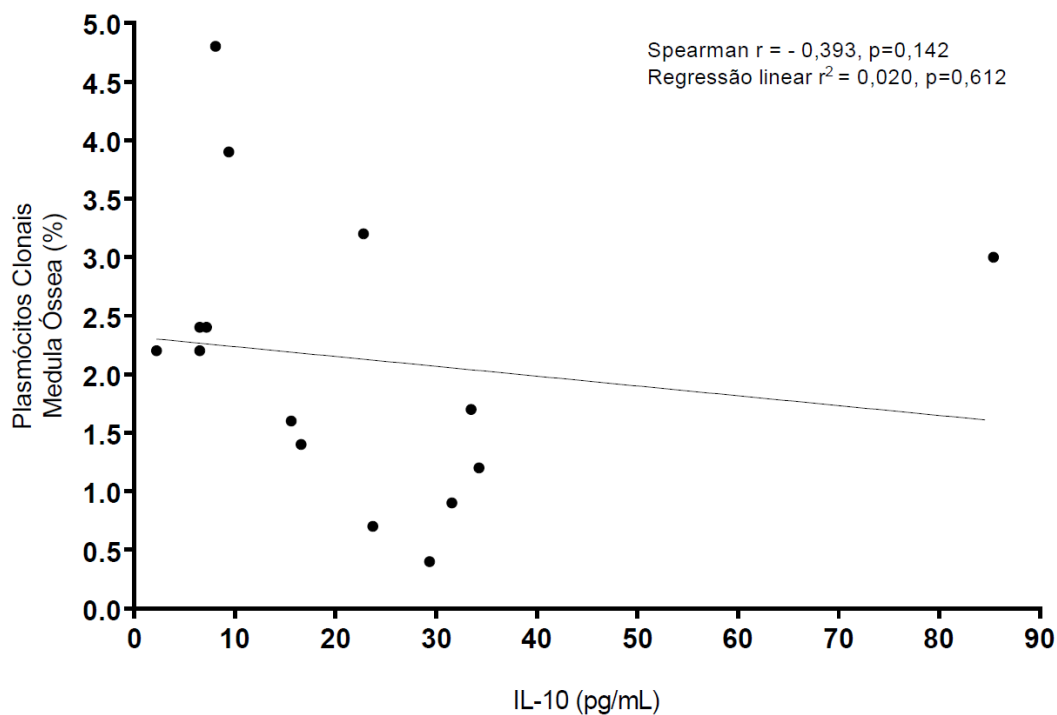


Gráfico 7. Concentração sérica da IL-12 conforme a pesquisa de doença residual mínima (DRM).

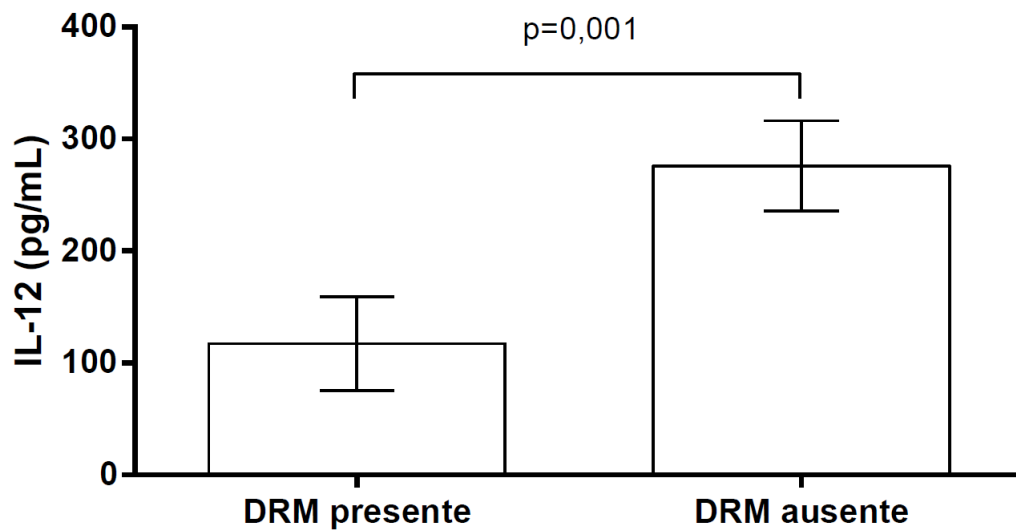


Gráfico 8. Correlação entre IL-12 e plasmócitos clonais na medula óssea.

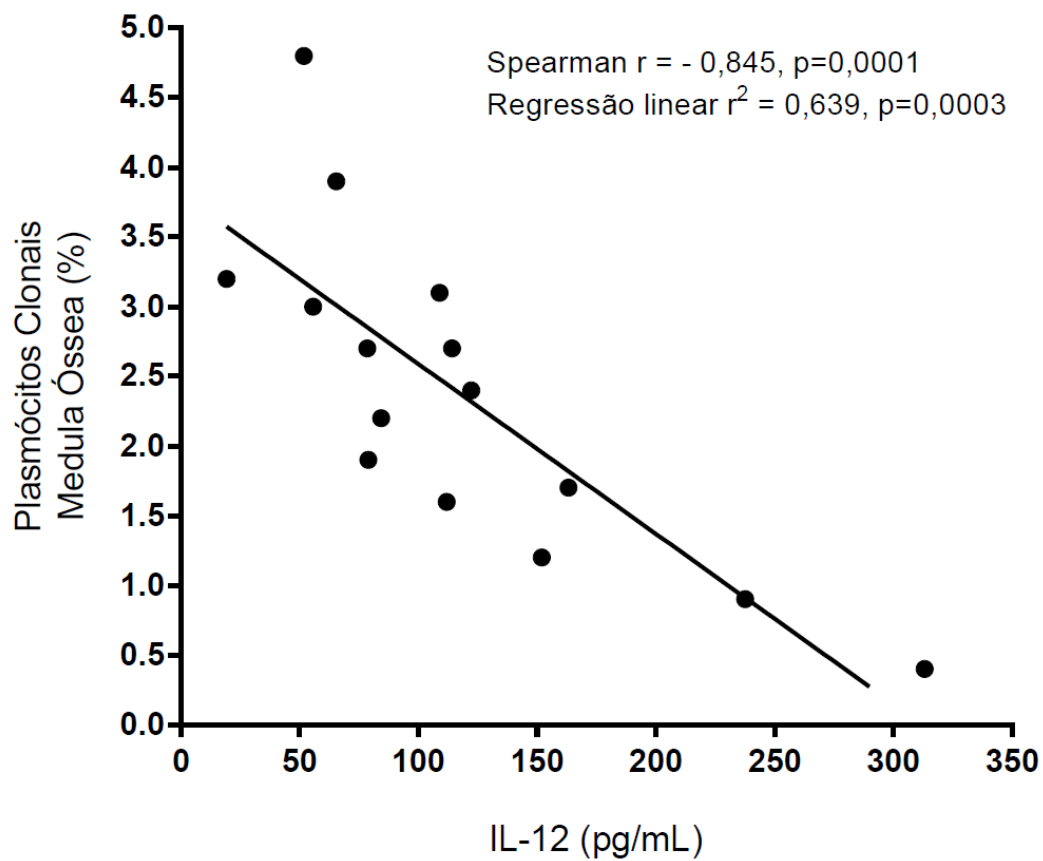


Tabela 9. Comparação entre as concentrações séricas das citocinas avaliadas nas fases pré-mobilização e pré-aférese do TCTH – autólogo. Dados expressos como média e erro padrão da média.

Citocina	Pré-mobilização (n=10)	Pré-aférese (n=30)	p
IL-1ra	25,1±6,2	23,3±6,7	0,883
IL-1b	4,0±0,6	4,2±0,8	0,890
IL-2	134,1±29,4	129,0±30,4	0,928
IL-4	6,5±1,3	6,2±1,0	0,875
IL-5	11,5±2,2	9,4±1,5	0,473
IL-6	11,6±6,7	13,9±4,4	0,789
IL-8	32,1±3,6	31,8±6,5	0,979
IL-10	10,9±3,1	8,5±2,1	0,558
IL-12	74,3±9,9	77,7±16,1	0,909
IL-13	3,7±0,4	3,2±0,4	0,500
IL-15	5,3±0,6	4,3±0,7	0,435
IL-17	46,7±35,5	49,5±31,2	0,961
INF-γ	258,7±26,2	292,4±58,1	0,744
GM-CSF	10,1±3,4	8,8±4,3	0,867
Klotho	59,2±18,9	59,8±30,7	0,991
TNF-α	7,5±0,9	7,8±2,7	0,949

Tabela 10. Comparação entre as concentrações séricas das citocinas avaliadas nas diferentes fases do TCTH – autólogo. Dados expressos como média e erro padrão da média.

Citocina	Pré-aférese (n=30)	Pós-aférese (n=30)	Aplasia medular (n=30)	Recuperação medular (n=30)	p
IL-1ra	23,3±6,7	30,6±9,6	10,3±3,1	20,2±4,2	0,0001
IL-1b	4,2±0,8	9,4±5,4	27,5±23,1	6,9±2,3	0,903
IL-2	129,0±30,4	106,0±24,2	128,0±23,6	142,0±23,2	0,327
IL-4	6,2±1,0	9,5±3,1	11,4±3,8	6,8±1,2	0,696
IL-5	9,4±1,5	9,2±1,4	38,7± 11,4	9,1 ± 1,4	0,0003
IL-6	13,9±4,4	72,5±59,1	78,7±37,5	15,9±4,3	0,443
IL-8	31,8±6,5	72,7±57,3	395,6±120,8	25,4±5,4	<0,0001
IL-10	8,5±2,1	8,6±2,7	10,8±2,1	20,4±3,3	<0,0001

IL-12	77,7±16,1	99,2±23,7	86,7±16,4	182,2±29,1	0,0001
IL-13	3,2±0,4	6,5±2,1	4,5±1,1	3,5±0,5	0,629
IL-15	4,3±0,7	8,5±4,0	9,2±3,6	6,1±1,0	0,111
IL-17	49,5±31,2	113,1±85,1	65,2±39,3	71,6±35,3	0,434
INF-γ	292,4±58,1	347,6±102,6	308,1±70,45	313,3±44,5	0,123
GM-CSF	8,8±4,3	11,5±6,1	6,2±3,2	4,7±2,4	0,150
Klotho	59,8±30,7	38,8±26,9	85,3±33,3	28,8±11,8	0,675
TNF-α	7,8±2,7	17,6±11,2	33,7±19,7	8,5±2,3	0,122

7 DISCUSSÃO

A IL-1 antagonista do receptor (ra) é um membro da família das interleucinas 1 que se liga aos receptores de IL-1, contudo não induz qualquer resposta intracelular. Algumas variantes da IL-1ra têm sido reportadas, principalmente aquelas de 16-KDa e 17KDa, habitualmente secretadas por monócitos, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos, e uma forma de 18KDa, caracteristicamente intracelular, encontrada no citoplasma de células epiteliais, fibroblastos e monócitos. A produção da IL-1ra pode ser estimulada por diversos fatores, incluindo componentes virais, bacterianos, imunoglobulina G (IgG) aderente e outras citocinas. Alguns estudos reportaram o papel anti-inflamatório da IL-1ra em doenças, como a artrite reumatoide, colites e doenças autoimunes (AKDIS et al., 2011).

Recentemente, os procedimentos de aférese foram associados com a produção de IL-1ra. Aparelhos de aférese seletiva que contêm colunas de adsorção de células podem remover granulócitos, monócitos e linfócitos do sangue periférico. Como exemplo, colunas de adsorção de acetato de celulose podem reduzir até 65% de granulócitos, 55% de monócitos/macrófagos e pequena proporção de linfócitos (2%), portanto podem fazer parte do planejamento terapêutico de algumas doenças autoimunes ou inflamatórias (LINDBERG et al., 2010).

Entretanto, a eficiência clínica desse procedimento não pode ser totalmente explicada apenas pela redução numérica de granulócitos e monócitos. Efeitos imunomodulatórios mediados por citocinas têm sido observados no período pós-aférese. Sakimura e colaboradores (2006) observaram que as aféreses seletivas, utilizadas terapeuticamente para depleção de granulócitos e monócitos, produzem um efeito anti-inflamatório em pacientes com colite ulcerativa. Nesse contexto experimental, pacientes que responderam ao tratamento apresentaram níveis séricos de IL-1ra significativamente elevados quando comparados aos não responsivos. O aumento da IL-1ra foi atribuído, entre outras possíveis causas, à ativação de granulócitos e monócitos após o contato com a coluna de adsorção.

A coleta de células-tronco periféricas por aférese segue princípios semelhantes, contudo não utiliza colunas de adsorção; a separação das células é basicamente realizada por gradientes de centrifugação e sensores específicos que separam leucócitos e eritrócitos. Nossos resultados evidenciaram aumento significativo da concentração sérica de IL-1ra no período pós-aférese quando comparado com outras fases do transplante autólogo.

Mosevoll e colaboradores (2013) estudaram quinze pacientes com MM tratados com o TCTH – autólogo e observaram que a aférese para coleta de células-tronco aumentou o nível plasmático de alguns mediadores, entre eles IL-1ra, ligante do CD40, CCL5 e CXCL 5, 8, 10 e 11. Nesse sentido, os autores sugeriram que o perfil de citocinas pode ser alterado pelo processo de aférese em pacientes com MM.

Nossos resultados sugerem que as condições clínicas e laboratoriais dos pacientes eram semelhantes no período pré-aférese (Tabelas 4, 5 e 6). Portanto, elementos contidos no processo da aférese poderiam explicar o aumento da IL-1ra no período pós-aférese. Até o momento, não há explicação inequívoca sobre os mecanismos envolvidos no aumento da IL-1ra, entretanto, com base em nossas condições experimentais e nos estudos citados, é razoável presumir a ocorrência de um efeito anti-inflamatório associado com a IL-1ra somente no período pós aférese.

A Interleucina 5 (IL-5) é uma glicoproteína homodimérica produzida por células T ativadas (Th2 CD4+), eosinófilos, mastócitos e basófilos, conhecida por estimular o crescimento e a diferenciação de células B e eosinófilos *in vitro*. Ratos IL-5 transgênicos apresentaram duas características marcantes, o aumento acentuado de células B-1, resultando no aumento de anticorpos séricos, principalmente as classes IgA, IgE e IgM, e o aumento do número de eosinófilos no sangue periférico e a infiltração eosinofílica em diferentes tecidos. Por outro lado, camundongos com deleção do gene funcional da IL-5 mostraram várias alterações numéricas e funcionais de células B e eosinófilos (TAKATSU; KOURO; NAGAI, 2009).

A IL-5 é fundamental na diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos, incluindo IgA em mucosas. Ademais, a IL-5 parece ter papel relevante na patogênese da asma e das doenças inflamatórias mediadas

por eosinófilos. As células progenitoras mieloides da medula óssea contribuem com o recrutamento de células pró-inflamatórias, como eosinófilos e basófilos, para tecidos-alvo em doenças alérgicas (IKUTANI et al., 2012).

Esse processo inflamatório pode ser mediado pela IL-5 produzida por linfócitos do trato respiratório estimulados por antígenos do ar respirado (GAUVREAU et al., 2009). Contrariamente, não observamos infecções respiratórias ou processos alérgicos durante a fase de aplasia medular que explicassem o aumento da IL-5 encontrado em nossos pacientes. Além disso, não houve aumento de eosinófilos ou basófilos nas amostras estudadas, conforme demonstrado na Tabela 7.

Em estudo recente, Park e colaboradores (2017) demonstraram a ação da IL-5 como um fator angiogênico. A IL-5 aumentou a proliferação, a migração e o número de colônias formadoras de tubos de células endoteliais advindas de veias de cordão umbilical. Os autores demonstraram que a neoformação vascular induzida pela IL-5 foi mediada pela ligação da IL-5 com seu receptor, IL-5R-alfa, em associação com a respectiva ativação da via óxido nítrico sintetase endotelial e a consequente estimulação da expressão da proteína de choque térmico 70-1 (Heat Shock Protein 70-1). Em outro modelo experimental utilizando anéis de aorta de camundongos, observaram que a presença da IL-5 aumentou significativamente o brotamento de vasos, bem como o tamanho da rede venosa tecidual.

Com base nas informações acima, o aumento dos níveis séricos da IL-5 observado no período de lesão medular após a quimioterapia de condicionamento poderia ser explicado pela necessidade de resposta humoral e produção de anticorpos, principalmente IgA, em mucosas, já que essa fase é caracterizada por processos inflamatórios (mucosites) e também pela alta probabilidade de infecções decorrentes da ausência temporária de neutrófilos. Além disso, a ação angiogênica da IL-5 no microambiente medular poderia ser importante no processo de reparação da lesão tecidual induzida pela ação citotóxica dos quimioterápicos.

Outras interleucinas apresentam potencial efeito angiogênico, incluindo a IL-8 (WAUGH; WILSON, 2008). A IL-8 é produzida por várias células, entre elas monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais,

principalmente quando estimuladas pela ação da IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-17 e FNT. A ativação e o recrutamento de neutrófilos aos locais de injúria tecidual são as principais funções atribuídas à IL-8. Em adição aos neutrófilos, a IL-8 também pode atrair células NK, linfócitos T, basófilos e eosinófilos, amplificando a resposta inflamatória (MUKAIDA, 2000). O aumento da concentração da IL-8 foi demonstrado em pacientes com doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (SEITZ et al., 1991).

Em relação ao período de aplasia medular, Tromp e colaboradores (2008) estudaram 73 pacientes com neutropenia febril pós-quimioterapia e verificaram que valores de IL-8 abaixo de 60 pg/mL estavam relacionadas com febre de origem indeterminada e valores acima com processos infecciosos. Por outro lado, Engel e colaboradores (2005) demonstraram em 147 episódios de neutropenia febril pós-quimioterapia que valores de IL-8 acima de 1000pg/mL associaram-se com pior prognóstico dos pacientes, incluindo choque séptico, insuficiência respiratória ou morte. Nosso estudo demonstrou aumento significativo das concentrações séricas da IL-8 no período de aplasia medular pós-condicionamento, entretanto não observamos concomitância com infecções graves ou prognósticos reservados em nossa amostragem. Por outro lado, observamos associação significativa entre o aumento dos níveis séricos de IL-8 e a presença de hemoculturas positivas, sugerindo uma eventual organização da resposta inflamatória contra micro-organismos, mesmo na ausência de células do sistema de defesa.

O aumento dos níveis séricos da IL-10 durante a fase de recuperação medular pode suportar estes achados. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, produzida por monócitos, linfócitos T, linfócitos B reguladores, macrófagos e células dendríticas (D'ANDREA et al., 1993), que apresenta importante papel na regulação negativa da resposta imune a agentes microbianos. Ademais, também atua na prevenção de repostas inflamatórias excessivas, proporcionando balanço adequado entre a resposta imune e a proteção tecidual (RUTZ; OUYANG., 2016).

Por sua vez, a família da IL-12 tem fundamental papel na regulação da resposta inflamatória de células T (GEE et al., 2009). Considerando esses aspectos, é razoável imaginar que os aumentos da IL-10 e IL-12 observados em

nosso trabalho poderiam representar a retomada de um equilíbrio homeostático do sistema imune no período de recuperação medular.

Um achado interessante foi a associação entre as concentrações de IL-12 na fase de recuperação medular e a pesquisa de DRM. A IL-12 foi identificada em 1989 como um fator estimulador de células natural killer (NK) com múltiplos efeitos biológicos em linfócitos do sangue periférico (GATELY et al., 1991). Trata-se de um heterodímero com peso molecular de 70 KDa formado por uma cadeia pesada (p70) e uma leve (p35) unidas covalentemente por uma ligação dissulfeto. A IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, e também por monócitos, macrófagos e células B por meio da ativação de receptores *Toll* de membrana, comumente chamados de receptores *Toll-like*. Caracteriza-se como uma interleucina pró-inflamatória em resposta a infecções, e a produção de sua forma biológica ativa pode ser aumentada por elementos como interferon gama, IL-5 ou por interações celulares via receptor CD40 - CD40 Ligante (MEDZHITOV, 2001).

Nas últimas duas décadas, vários estudos, incluindo alguns pré-clínicos, têm demonstrado a atividade antitumoral da IL-12 (TUGUES et al., 2015). Dependendo do tipo e da localização tumoral, a IL-12 parece proporcionar uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa, proporcionando vários efeitos nas células do sistema imune que compõem o microambiente tumoral.

A IL-12 tem efeito sobre as células NK, linfócitos T e células linfoides inatas que estimulam vários mecanismos antitumorais, como a produção de perforinas e granzima B, o aumento da apoptose por meio da expressão do receptor Fas, o aumento da expressão de moléculas de adesão, facilitando o recrutamento de leucócitos no tumor, bem como a estimulação da expressão de antígenos tumorais pelas células apresentadoras de antígenos, resultando em diferentes formas de citotoxicidade mediada por linfócitos CD8 e CD4.

O potente efeito antitumoral da IL-12 em modelos experimentais justificou sua utilização em ensaios clínicos. Estudos de segurança foram reportados em pacientes com carcinoma renal metastático, melanoma, carcinoma de cólon, mieloma múltiplo, linfoma Hodgkin, tumores de ovário e carcinomas de cabeça e pescoço (YOUNES et al., 2004). Os resultados preliminares sugerem algum

papel da IL-12 no controle de tumores, entretanto mais estudos são necessários para a utilização terapêutica de rotina nas unidades oncológicas.

Em nosso estudo, observamos que 50% dos pacientes não apresentaram DRM (RAWSTRON et al., 2013), resultados comparáveis com os de estudos anteriores que demonstraram ausência de DRM em 42% a 58% dos pacientes com MM tratados com o TCTH – autólogo. Diante dos argumentos apresentados, o efeito antitumoral da IL-12 poderia explicar, pelo menos em parte, a maior concentração de IL-12 em pacientes sem DRM, bem como a correlação inversa encontrada entre os níveis séricos de IL-12 na recuperação medular após o TCTH – autólogo e o percentual de células plasmáticas clonais na medula óssea de pacientes com DRM positiva.

Finalmente, o presente estudo tem várias limitações. A maioria dos pacientes referenciados para o serviço de transplante de medula óssea participante do presente estudo (mais de 80%) advém do Sistema Único de Saúde (SUS). Não há autorizações ou recursos disponíveis para a utilização de tratamentos que incluam lenalidomida ou inibidores de proteassoma. Protocolos como ciclofosfamida e dexametasona, ciclofosfamida e dexametasona combinados com talidomida produzem baixas taxas de resposta completa, contudo ainda são utilizados na prática diária do SUS. Vigolo e colaboradores (2017) compararam as taxas de resposta de pacientes brasileiros com MM obtidas com os protocolos ciclofosfamida, dexametasona, talidomida e ciclofosfamida, dexametasona associados com bortezomibe (inibidor de proteassoma) e demonstraram RC de 7,1% e 45,5%, respectivamente. Esses fatos podem explicar a grande proporção de pacientes classificados como RP em nossa amostragem.

Não observamos eventual associação entre o tipo de resposta terapêutica (RC, RPMB ou RP) e a produção de citocinas provavelmente devido ao grande número de pacientes em RP. Em estudo semelhante, Wang e colaboradores (2012) avaliaram o perfil de várias citocinas em 63 pacientes com MM durante todas as fases do TCTH – autólogo. Nessa casuística, 97% dos pacientes foram tratados com protocolos baseados em inibidores de proteassoma (53 pacientes) ou lenalidomida (12 pacientes), e resultados diferentes foram reportados. Houve diminuição da IL-1ra no dia +5, aumento da IL-6 no dia +9, manutenção da IL-8

em valores próximos a zero durante todas as fases do transplante e ausência de alterações em outras, incluindo a IL-12. Assim como em nosso estudo, os referidos autores encontraram aumento da IL-10 na fase de recuperação medular e ausência de alterações temporais do TNF-alpha, fato inesperado principalmente no período de aplasia medular pós-condicionamento. Baseados nos elementos descritos, especula-se sobre o papel do tipo de resposta terapêutica (RC, RPMB ou RP) no perfil de marcadores pró e anti-inflamatórios ao longo das diversas fases do TCTH – autólogo. Ademais, os autores não fizeram avaliações ligadas ao processo de aférese ou eventos adversos durante a fase de aplasia.

Embora as diferenças observadas tenham sido significativas, os resultados encontrados devem ser confirmados com maior número de pacientes. Os dados basearam-se em comparações entre tempos diferentes de um mesmo procedimento, contudo não foram comparados com grupos controle. A coleta de amostras foi realizada no período da manhã, conforme as rotinas estabelecidas para os pacientes transplantados, limitando seu número. Possivelmente, mais amostras advindas das diferentes fases proporcionariam informações mais detalhadas. A definição imunofenotípica das populações celulares nas fases do transplante possibilitaria melhor compreensão das alterações do perfil de citocinas.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos, o estudo determinou as concentrações séricas de 16 citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em amostras de pacientes com MM obtidas das diferentes fases do TCTH – autólogo. Os resultados sugerem que citocinas com variados níveis de expressão podem ser encontradas nas diferentes fases do TCTH – autólogo. Os níveis de IL-1ra tendem a aumentar no período pós-aférese, sugerindo um papel anti-inflamatório induzido pelo processo de aférese. A resposta caracterizada pelo aumento das concentrações de IL-5 e IL-8 no período de aplasia medular pós-condicionamento parece exercer efeito contra infecções. O aumento dos níveis de IL-10 e IL-12 sugere possível efeito regulatório da resposta inflamatória no período de recuperação medular, e a IL-12 parece associar-se inversamente com a presença de doença residual mínima.

Nossos achados podem servir como base para novas investigações sobre: 1) Os mecanismos envolvidos na produção da IL-1ra após o procedimento de aférese; 2) O papel angiogênico da IL-5 e da IL-8 no período de aplasia medular e sua possível influência na recuperação medular; 3) A associação entre DRM e IL-12 na recuperação medular; e 4) A eventual utilização da IL-12 como terapia complementar após o TCTH – autólogo de pacientes com MM.

9 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP conforme as diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos, regulamentadas pela Resolução CNS 466/12 sob o parecer 2.564.035/2017.

O desenvolvimento deste estudo não acarretou riscos aos participantes, uma vez que as amostras de sangue periférico utilizadas fazem parte da rotina diária de exames de avaliação dos pacientes tratados com o TCTH autólogo.

O estudo envolveu aspectos de confidencialidade e sigilo das informações. Em hipótese alguma foram divulgados os nomes dos participantes ou outras informações que pudessem identificá-los. Para manter o sigilo das informações dos participantes foram utilizados, como forma de rastreamento códigos numéricos atribuídos às iniciais dos nomes dos pacientes.

Ademais, todos pacientes assinaram e receberam 1 via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo).

REFERÊNCIAS

ACS – American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society, 2016.

Akdis M, et al. Interleukins, From 1 to 37, and Interferon- γ : Receptors, Functions, and Roles in Diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):701-21.e1-70.

Alibhai S M, DURBANO S, BREUNIS H. et al. A Phase II Exercise Randomized Controlled Trial for Patients With Acute Myeloid Leukemia Undergoing Induction Chemotherapy. *Leuk Res*. 2015 Aug 28;S0145-2126(15)30365-9.

Al-Majid S, Gray DP. A biobehavioral model for the study of exercise interventions in cancer-related fatigue. *Biol Res Nurs*. 2009 Apr;10(4):381-91.

Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med*. 2003;54:491-512.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa, A M. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1996 Jul 11;335(2):91-7.

Battaglini CL, Bottaro M, Campbell JS. Atividade física e níveis de fadiga em pacientes portadores de câncer. *Rev Bras Med Esporte*. 2004 Abr. 10(2): 98-104.

Berrino F. Life style prevention of cancer recurrence: the yin and the yang. *Cancer Treat Res*. 2014; 159:341-51.

Braam KI. Van Der Torre P, Takken T. Physical exercise training interventions for children and young adults during and after treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Apr 30;(4):CD008796

Brasil. Ministério da Saúde – Secretaria de Atenção à Saúde. *Diretrizes diagnósticas e terapêuticas para o Mieloma Múltiplo*. Portaria nº 708, de 6 de agosto de 2015. Disponível em:

http://conitec.gov.br/images/Protocolos/ddt_Mieloma-Multiplo.pdf. Acesso em: 14 set. 2016.

Brown JC, Winters-Stone K, Lee A, Schmitz KH. Cancer, physical activity, and exercise. *Compr Physiol*. 2012 Oct;2(4):2775-809.

Bruserud O, Kittang AO. The chemokine system in experimental and clinical hematology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 341:3-12.

Bruserud O, Ryningen A, Olsnes AM, et al. Subclassification of patients with acute myelogenous leukemia based on chemokine responsiveness and constitutive chemokine release by their leukemic cells. *Haematologica*. 2007; 92: 332-341.

Callander NS, Roodman GD. Myeloma bone disease. *Semin Hematol*. 2001; 38 (3): 276-85.

Coleman EA, Hall-Barrow J, Coon S. Facilitating exercise adherence for patients with multiple myeloma. *Clin J Oncol Nurs*. 2003; 7(5): 529-34.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med*. 2006; 354:1813-26.

Courneya K. S. Exercise in cancer survivors: an overview of research. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35(11): 1846-52.

Curfs JH, MEIS JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol. Rev*. 1997; 10: 742-80.

D'andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178: 1041-48.

Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL, et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia.* 2009; 23(9): 1545-56.

Dispenzieri A, Kyle RA. Multiple Myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18: 553-68.

Edelstyn GA, Gillespie PJ, Grebbel FS. The radiological demonstration of osseous metastases. Experimental observations. *Clin Radiol.* 1967; 18(2):158-62.

Engel A, Knoll S, Kern P, Kern WV. Interleukin-8 serum levels at fever onset in patients with neutropenia predict early medical complications. *Infection.* 2005; 33(5-6): 380-2.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. (Eds.) GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and prevalence Worldwide in 2012. *International Agency for Research on Cancer.* Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-2012> Acesso em: 01 mai. 2017.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015, mar; 136(5): 359-86.

Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizzonite R, Gubler U. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor) *J Immunol.* 1991; 147:874–882.

Gauvreau GM, ELLIS AK, Denburg JA. Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clin Exp.Allergy.* 2009; 39(9): 1297-1306.

Gee K, Guzzo C, Che NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009; 8(1): 40-52.

Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1988. Accreditation Sub-Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant,* 1988; 21(1): 1-7.

Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *Semin. Hematol.* 2001; 38: 139-147.

Hakon R, Kimberley JH, Hanne F, Ina N, Knut AM, Oystein B. The angioregulatory cytokine network in human acute myeloid leukemia – from leukemogenesis via remission induction to stem cell transplantation. *Eur. Cytokine Netw,* 2012; 23(4):140-53.

Harousseau JL, Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N England J. Med.* 2009; 360(25):2645-54.

Heim ME, Malsburg ML, Niklas A. Randomized controlled trial of a structured training program in breast cancer patients with tumor-related chronic fatigue.

Onkologie. 2007; 30(8-9):429–34.

Hoffbrand AV. *Fundamentos em hematologia*. Porto Alegre: Artmed, 2008, p. 139-157

Howlander N, Noone AM, Krapcho M. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012*. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/. Acesso em: 19 set. 2016.

Hungria VT, Maiolino A. Mieloma Múltiplo: progressos e desafios. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2007; 29(1).

Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica.*, 2008; 93(5):791–2.

IARC – International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report 2014*. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> Acesso em: 19 set. 2016.

Ikutani M, et al. Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *J Immunol.*, 2012, jan.; 188(2):703-713.

IMWG. Criterio for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J Haematol.* 2003; 121(5): 749-57.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa, 2016*. Rio de Janeiro: 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em: 22 ago. 2016.

Júnior DM, Araujo JP, Catelan T. Sistema Imunitário – Parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(5): 552-80.

Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al, Interleukin 6 is the central tumor growth factor in vitro and in vivo in multiple myeloma. *Eur Cytokine New.* 1990; 1:193.

Kornblau SM, McCue D, Singh N, Chen W, Estrov Z, Coombes KR. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood.* 2010; 116: 4251-4261.

Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(11):1401-14.

Kruk J, Aboul-Enein HY. Physical activity in the prevention of cancer. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2006; 7(1):11-21.

Kyle RA, GERTZ MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78(1):21-33.

Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000; 127:117-126.

Lindberg A, Eberhardson M, Karlsson M, Karlen P. Long-term follow-up with Granulocyte and Monocyte Apheresis re-treatment in patients with chronically active inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2010; 6(10):73.

Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone marrow Transplant.* 2010; 45(2):219-234.

Mangan P. Recognizing multiple myeloma. *Nurse Pract.* 2005; 30(3):14-27.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1:135–145.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria GM/MS número 931 de 2 de maio de 2006, Portaria número 940 de 21 de dezembro de 2006 e Portaria GM número 2600 de 21 de outubro de 2009.

Minnicelli C, Maciel JFR, Hassan R, et al. Clinical and epidemiological features of multiple myeloma patients from a low socio-economic region of Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.*, 2015; 37(5):354–355.

Mosevoll KA, Akkök ÇA, Hervig T, Melve GK, Bruserud O, Reikvam H. Stem cell mobilization and harvesting by leukapheresis alters systemic cytokine levels in patients with multiple myeloma. *Cytotherapy.* 2013; 15(7):850-60.

Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol.* 2000; 72(4):391-8.

Normaton M, Marti, LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein.* 2013; 11(2):237-46.

Oliveira CMB, et al. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 2011; 61(2).

Park SL, et al. HSP70-1 is required for interleukin-5-induced angiogenic responses through eNOS pathway. *Scientific Reports.* 2017; 7:44687.

Parkin DM, Whelan SL, Ferla J, et al. *Cancer Incidence in Five Continents.* Lyon: IARC, 2002.

Ponder BA. Cancer genetics. *Nature.* 2001; 411(6835):336-41.

Rawstron AC, et al. Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(20):2540-2547.

Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA, et al. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnose myeloma. *J Clin Oncol.* 2002; 20(4):329-23.

Reikvam H, Mosevoll KA, Melve GK, Gunther CC, Sjo M, Bentsen PT, et al. The pretransplantation serum cytokine profile in allogeneic stem cell recipients differs from healthy individuals, and various profiles are associated with different risks of posttransplantation complications. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18(2):190–9.

Richardson PG, Sonneveld P, Scuster MW, et al. Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2005; 352(2):487-98.

Rodin G, Lloyd N, Katz M, et al. The treatment of depression in cancer patients: a systematic review. *Support Care Cancer.* 2007; 15(2):123-36.

Rudin CM, Thompson CBB-Cell Development and Maturation. *Seminar in Oncology.* 1998; 25(4):435-46.

Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 941:89-116.

Ryan JL, Carroll JK, Ryan EP, et al. Mechanisms of cancer related fatigue. *Oncologist.* 2007; 12:22–34.

Saad ED, Hoff PM, Carnelos RP, Katz A, Novis Y, Pietrocola M, et al. Critérios comuns de toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos. *Revista Brasileira de Cancerologia*.2002; 48:63-96.

Sakimura K, et al. Clinical Response Is Associated with Elevated Plasma Interleukin-1 Receptor Antagonist During Selective Granulocyte and Monocyte Apheresis in Patients with Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 2006; 51:1525–1531.

Schubert C, Hong S, Natarajan L, et al. The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: a quantitative review. *Brain Behav Immun*. 2007; 21(4):413–27.

Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1991; 87:463-9.

Seyfried TN, Flores RE, POFF AM, D'agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014; 35(3):515–527.

Sommer C, White F. *Cytokines, Chemokines, and Pain*. Pharmacology of Pain. 1ª ed. Seattle: IASP Press, 2010.

Suematsu S, Hibi M, Sugita T, et al, Interleukin 6 (IL-6) and its receptor (L-6R) in myeloma/plasmocitoma. *Curr. Top. Microbiol Immunol*. 1990; 166:13.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4ª ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.

Takatsu K, Kouro T, Nagai, Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol*. 2009; 101:191-236.

Tromp YH, Daenen SM, Sluiter WJ, Vellenga E. The predictive value of interleukin-8 (IL-8) in hospitalised patients with fever and chemotherapy-induced neutropenia. *Eur. Journal of Cancer*. 2009; 45(4):596-600.

Tugues S, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ*. 2015; 22(2):237–246.

Vigolo S, Zuckerman J, Bittencourt RI, Silla L, Pilger, D. A. Comparison of cyclophosphamide-thalidomide-dexamethasone to bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone as induction therapy for multiple myeloma patients in Brazil. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017; 10(3):135-142.

Wang XS, et al. Inflammatory markers and development of symptom burden in patients with multiple myeloma during autologous stem cell transplantation. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(5):1366–1374.

Wang XS, et al. Inflammatory cytokines are associated with the development of symptom burden in patients with NSCLC undergoing concurrent chemoradiation therapy. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(6):968–74.

Wang XS, et al. Serum interleukin-6 predicts the development of multiple symptoms at nadir of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer*. 2008; 113(8): 2102–9.

Wang XS, Williams LA, Krishnan S, Liao Z, Liu P, Mao L, et al. Serum sTNF-R1, IL-6, and the development of fatigue in patients with gastrointestinal cancer undergoing chemoradiation therapy. *Brain Behav Immun*. 2012; 26(5):699–705.

Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(21):6735-41.

Younes A, et al. Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(16):5432-8.

Zhang JM, Na J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007; 45:27-37.

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro, para os devidos fins, que fui devidamente informado (a) sobre a pesquisa intitulada “Avaliação do perfil de citocinas nas diferentes fases do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com mieloma múltiplo”.

Estou ciente de que todos os procedimentos são feitos de forma gratuita, não havendo despesas ou ônus de qualquer natureza da minha parte.

Fui informado(a) sobre o processo de coleta de amostras de sangue periférico durante as fases pré-aférese, pós aférese, aplasia medular e recuperação medular, de acordo com o estudo.

Minha participação é voluntária, livre de qualquer coação ou obrigação. Ficam-me assegurados os seguintes direitos: liberdade para interromper a participação a qualquer momento do estudo, de acordo com a minha vontade. Também é assegurada a mim, a confidência de qualquer dado pessoal, assim como o sigilo de minha identidade.

Declaro ainda que fui informado de que os resultados obtidos poderão ser utilizados em publicações e estudos futuros e que o pesquisador responsável conduzirá a pesquisa de acordo com as exigências da **Resolução CNS 466/12**, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos. Nestes termos, autorizo a publicação dos resultados sem que meu nome seja divulgado.

Eu, _____,
após ter lido e entendido as informações, e ter tido minhas dúvidas esclarecidas, **concordo voluntariamente** em participar deste estudo, podendo receber informações adicionais com os pesquisadores abaixo referidos ou entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo telefone (11) 3893-4401 ou e-mail cep.fm@usp.br.

Assinatura do paciente/voluntário

Pesquisador responsável - Professor Dr. Rodolfo de Paula Vieira
rodrelena@yahoo.com.br
(12) 99141-0615

Pesquisadora executante – Alexandra Fernandes Callera - CRF 65672
alexandra.callera@gmail.com
(12) 98129-7605