

Impacto de los polimorfismos del gen TGFB1 en trasplante alogénico relacionado.



ARTÍCULO ORIGINAL

Transforming Growth Factor-B1 Functional polymorphisms in myeloablative sibling hematopoietic stem cell transplantation.

Berro M¹, Palau V², Rivas M¹, Foncuberta C³, Vitriu A³, Remaggi G⁴, Martínez Rolon J⁴, Jaimovich G⁵, Requejo A⁵, Feldman L⁵, Larripa², Padros K⁶, Rodriguez MB⁶, Kusminsky G¹

¹Unidad de Trasplante Hematopoyético, Hospital Universitario Austral, Argentina,

²Academia Nacional de Medicina, Argentina,

³Unidad de Trasplante Hematopoyético, Instituto Alexander Fleming, Argentina,

⁴FUNDALEU, Argentina,

⁵Unidad de Trasplante Hematopoyético Fundación Favaloro,

⁶PRICAI, Argentina.

berromariano@hotmail.com

Trabajo pre-seleccionado a premio en el marco del XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Hematología

Fecha de recepción: 10/03/2016

Fecha de aprobación: 13/04/2016

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 n° 1: 42-49
Enero - Abril 2016

Palabras clave: Trasplante de células precursoras hematopoyéticas, TGFB1, Polimorfismos.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation, TGFB1, Polymorphisms,

Resumen

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (HSCT) es una herramienta terapéutica necesaria para el tratamiento de diferentes patologías oncohematológicas. Más allá de la importancia de los genes de HLA, otros aspectos de la in-munogenética son importantes. TGFB1 es una citoquina involucrada en numerosos procesos inmunomoduladores. Se han descrito varios polimorfismos funcionales en el gen de TGF-B1 entre ellos polimorfismos de nucleótido único (SNP) del codón 10 del exón 1. Previamente publicamos un trabajo en el que demostramos el impacto de este SNP en el HSCT no relacionado (NR) mieloablativo, prin-

cialmente sobre la mortalidad libre de enfermedad (MLE) y la enfermedad injerto-vs-huésped aguda (EICHa). En el presente estudio evaluamos el impacto de este SNP en el HSCT relacionado. Genotificamos mediante una técnica de PCR alelo específica para el SNP del codón 10, 245 pares de paciente-donante que recibieron un HSCT relacionado en nuestros centros. Los trasplantes fueron realizados entre 01/2000-12/2014, la media de seguimiento fue de 4.4 años. No se observaron impactos significativos en la cohorte completa. Cuando analizamos la población de trasplantes mieloablativos hallamos diferencias significativas. Los pa-

cientes 10CC tuvieron un incremento significativo en la incidencia de EICHa III-IV (22% vs 7.2%, $p=0.01$) mientras que los donantes 10CC presentaron más EICHc extenso (32% vs 16%, AMV HR 9.0, 95% CI 1.3-62.5, $p=0.02$). En cuanto al impacto en la mortalidad, los pacientes 10CC tuvieron un aumento en la mortalidad relacionada al trasplante al año (29% vs. 7%, AMV HR 7.1, 95% CI 1.3-37.1, $p=0.02$) así como en la MLE (1-5 años CC 28-32% vs. TC/TT 7-10%, Gray's test $p<0.01$; HR 5.1, 95% CI 1.36-19.2, $p=0.01$). El hallazgo más novedoso fue en relación al genotipo de los donantes. Los receptores de donantes 10TT tuvieron un incremento significativo en la tasa de recaída (1-5 años TT 37-51% vs. TC 19-25% vs. CC 13-19%, Gray's test $p=0.02$, HR 2.4, 95% CI 1.2-4.9, $p=0.01$), una tendencia a

una menor SLE (1-5 años 57-36% vs. 73-63%, log rank $p=0.05$, HR 2.5, 95% CI 0.97-6.5 $p=0.05$) y una reducción significativa en la SG comparado con los otros genotipos (1-5 años TT 69- 50% vs. TC/CC 77-69%, log-rank $p=0.04$, HR 1.9, 95% CI 0.99-3.8, $p=0.05$). Mas allá de confirmar que al igual que en los NR los pacientes CC tienen un incremento en la MLE, encontramos que el HSCT relacionado mieloablato los donantes TT podrían asociarse a un incremento en la tasa de recaída con una reducción significativa en la SG. Si bien estos hallazgos deben ser confirmados, la identificación de estos polimorfismos pre trasplante puede ayudar a seleccionar los acondicionamientos e inmunosupresión así como también el donante ideal.

Summary

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) using sibling donors is a life- saving intervention for patients with hematological malignancies. Numerous genetic factors in both patient and donor play a role in the outcome of the procedure. Several functional polymorphisms have been identified in TGF-B1 gene, such as a single nucleotide polymorphism (SNP) at codon 10 of exon 1. We have previously published significant impact of this SNP on unrelated donor (UD) transplant outcome. We hypothesized that TGF-B1 SNP may influence the outcome of sibling donor HSCT similarly to UD. Two hundred and forty five patient/donor pairs who underwent a sibling donor HSCT in our centers were genotyped for the presence of a SNP at codon 10 and 25 by an allele-specific PCR. Transplants took place between January 2000 and December 2014 and the median follow up time was 4.4 years. Codon 10 SNP did not impact clinical outcomes in the whole cohort. When we analyzed the myeloablative cohort, significant differences were found. Patients 10 CC had more aGvHD III-IV compared to TT/TC (22% vs 7.2%, $p=0.01$). Additionally 10 CC donors were associated with an increase in severe chronic GvHD (32% vs 16%, MA HR 9.0, 95% CI 1.3-

62.5, $p=0.02$). Regarding survival outcomes, codon 10 CC patients had a significant increase in 1 year treatment related mortality (29% vs. 7%, MA HR 7.1, 95% CI 1.3-37.1, $p=0.02$) and NRM (1-5 years CC 28-32% vs. TC/TT 7-10%, Gray's test $p<0.01$; HR 5.1, 95% CI 1.36-19.2, $p=0.01$). Codon 10 TT donor's receptors experienced a significant increase in relapse rate (1-5 years TT 37-51% vs. TC 19-25% vs. CC 13-19%, Gray's test $p=0.02$, HR 2.4, 95% CI 1.2-4.9, $p=0.01$) a trend to a lower DFS (1-5 years 57-36% vs 73-63%, log rank $p=0.05$, HR 2.5, 95% CI 0.97-6.5 $p=0.05$) and a significant decrease in OS compared to other genotypes (1-5 years TT 69-50% vs. TC/CC 77-69%, log-rank $p=0.04$, HR 1.9, 95% CI 0.99-3.8, $p=0.05$). We confirm our previous findings in UD, that patient codon 10 CC results in an increase in NRM. In addition we found that in sibling donor-myeloablative HSCT codon 10 TT donors might be associated with an increase in relapse rate with a consequent decrease in DFS and OS. These results should be confirmed in larger series. Identification of these SNPs pre-transplant will allow for transplant conditioning and immunosuppression regimens to be tailored to the individual patient, as well as assisting in the most appropriate choice of donor.

Introducción

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TACPH) es una herramienta con potencial curativo para varias enfermedades hematológicas tanto benignas como malignas, aunque asociado con una alta morbi-mortalidad. Sin embargo, los resultados han mejorado considerablemente a lo largo de los años gracias a cambios en los regímenes de acondicionamiento e inmunosupresión junto con un progreso significativo en el cuidado post trasplante⁽¹⁾.

Diversos aspectos genéticos tanto en los pacientes como en los donantes impactan en los resultados post trasplante. Además de los ya conocidos genes de HLA clase I y II⁽²⁾ otros genes han sido asociados con el éxito de este procedimiento.⁽³⁻⁵⁾ El factor transformante de crecimiento B1 (Transforming growth factor B1, TGF- B1) es miembro de una familia de factores de crecimiento con un amplio repertorio funcional y se lo asocia a la regulación de diversos procesos inmunomodulatorios y profibróticos.⁽⁶⁻⁹⁾

Se han descrito varios polimorfismos funcionales en el gen TGFB1, entre los cuales se destacan los polimorfismos de nucleótido único (SNP) del codón 10 (codificante(c).29T>C, proteína(p).L10P) y del codón 25 (c.74G>C, p.A25P) del exón 1.

Ambos SNPs se encuentran localizados en la región que codifica para el péptido señal⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

TGF-β1 es secretado como una pre-proteína y clivado desde la parte carboxiterminal en el complejo de Golgi⁽¹¹⁻¹²⁾. El codón 10 está localizado en el centro del core, una secuencia habitualmente formada por 8-15 aminoácidos hidrofóbicos⁽¹²⁾, y el cambio de leucina (altamente hidrofóbica) por una prolina (no polar) podría alterar la estructura terciaria del péptido y, por lo tanto, modificar el proceso de secreción. Si bien se han publicado resultados contradictorios al respecto, el alelo C del codón 10 se describiría como el de mayor producción.⁽¹²⁻¹⁴⁾

La presencia de estos polimorfismos funcionales podría influir en la modulación de la respuesta inmune desencadenada durante las diversas etapas asociadas al TACPH. Previamente habíamos evaluado la influencia de las variantes polimórficas del codón 10 de TGFB1 en el TACPH no relacionado (NR). Los pacientes 10CC presentaron un incremento significativo en la mortalidad libre de enfermedad (MLE) y una reducción significativa en la sobrevida global

(SG), lo cual fue confirmado mediante un análisis multivariado. Además, en el sub-análisis de la cohorte de trasplantes histoidénticos 10/10, la presencia del alelo C en el par receptor-donante se asoció con un aumento significativo en la incidencia de la enfermedad injerto vs. huésped aguda (EICHa) y de sus formas clínicamente significativas (grados II-IV).⁽¹⁵⁾

Con respecto al TACPH con donante relacionado (DR), diversos trabajos realizados con cohortes pequeñas han analizado el impacto de este SNP y el EICHa con resultados variables. El aumento en la incidencia de EICHa ha sido previamente asociado con la presencia del alelo C tanto en el donante⁽¹⁶⁾ como en el receptor.⁽¹⁷⁾ Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no hay antecedentes que evalúen el impacto de estos SNP y la sobrevida luego del trasplante en términos de MLE, recaída y SG.

Objetivos

De acuerdo a lo expuesto, nuestro objetivo fue evaluar el impacto de los SNPs de los codones 10 y 25 de TGFB1 en el HSCT DR en términos de EICH, sobrevida luego del trasplante tanto MLE, recaída como SG.

Materiales y Métodos

Características de los Pacientes

Realizamos la genotipificación para la presencia del SNP de los codones 10 y 25 en una serie de 245 pacientes y sus respectivos donantes. Los pacientes recibieron un TACPH DR en nuestros centros y toda esta experiencia fue realizada íntegramente en nuestro país. Los trasplante se llevaron a cabo entre 01/2000 y 01/2015 y la media de seguimiento fue de 4.4 años. El proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario Austral. Los diagnósticos más prevalentes fueron leucemia mieloide aguda en 28% de los casos, leucemia linfoblástica aguda 23%, síndrome mielodisplásico 15% y linfoproliferativos 12%. El acondicionamiento fue mieloablatoivo en el 64% de los pacientes (busulfán ciclofosfamida fue el esquema mieloablatoivo más empleado y esquemas basados en fludarabina melfalán entre los no mieloablatoivos). La mayoría de los pacientes recibió tacrolimus metotrexato como esquema de profilaxis de EICH. Las características principales de la cohorte se encuentran en detalle en la **tabla 1**.

TGFBI en Trasplante Alogénico Relacionado

Tabla 1. Características de la Cohorte (N 245)		N (%)
Pacientes, edad (media 32 años)	< 40 años	160 (66)
	40 años	82 (34)
Donantes, edad media 34 años)	< 30 años	64 (37)
	≥ 30 años	111 (63)
	Faltantes	70
Pacientes, sexo	Masculino	144 (59)
	Femenino	101 (41)
Donantes, sexo	Masculino	140 (58)
	Femenino	100 (42)
Diagnósticos	LMA	68 (28)
	LLA	57 (23)
	SMD	31 (13)
	Linfoproliferativos	30 (12)
	NMP	22 (9)
	Otros	37 (15)
Estudio	Temprano	93 (44)
	Tardío	119 (56)
	Faltante	33
Acondicionamiento	Mieloablativo	156 (64)
	Intensidad Reducida	89 (36)
Acondicionamiento, II	BuCy	79 (33)
	TBI-Cy	56 (23)
	Fludarabine + (RIC)	67 (29)
	TimoCy	11 (14)
	Otros	32 (11)
Inmunosupresión	Tacrolimus + Mtx	132 (54)
	Ciclosporina + Mtx	42 (18)
	Otros	49 (25)
	Ninguna	7 (3)
Fuente	CMSP	210 (88)
	Médula Osea	28 (11)
	Faltante	7

Métodos de genotipificación

El material de ADN fue obtenido de muestras almacenadas pre-trasplante para el estudio de HLA. La genotipificación fue realizada mediante PCR alelo específica utilizando los primers descriptas por Perrey y col.⁽¹⁸⁾ y el control interno de amplificación β-globina humana (HBB). Las condiciones estándar de reacción utilizadas fueron: 200 ng de ADN, concentración de primers adecuada (0,6-codón 10/0,5-codón 25 y 0,8/0,9 μM-HBB), 100 μM de dNTPs, KCl 50 mM, MgCl2 1,5 mM, Tris/HCl 10 mM pH 8,3 y Taq ADN

polimerasa 0,45 U (Promega), en un volumen final de 25 μL. El termociclado consistió de desnaturalización inicial a 95°C 3', seguido de 10 ciclos de 95°C 30", 65°C 50", 72°C 45", luego 25 ciclos de 95°C 30", 59°C 50" y 72°C 45", finalizando con una extensión de 72°C 3'. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas fue de 240pb (codón 10), 233pb (codón 25) y 630pb (HBB).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue hecho con SPSS versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y R versión 2.9.1 (<http://r-project.org>). Para los análisis univariados, la SG y sobrevida libre de enfermedad (SLE) se utilizó log-rank (Kaplan-Meier). Para recaída y MLE se utilizó el Gray's test (incidencia acumulada), el evento competitivo para MLE fue recaída, para recaída fue MLE. EICHa, EICH crónico (EICHc), mortalidad al día 100 y al año, engraftment y causa de mortalidad se analizó mediante Chi2. En cuanto a los análisis multivariados (ANM), para las variables tiempo-dependientes se utilizó el método de Cox y para las dicotómicas la regresión logística. El nivel de significancia estadístico se fijó en $p < 0,05$, la tendencia entre 0.05-0.1 y las variables incluidas en el análisis multivariado debieron presentar una $p < 0.2$ previamente en el análisis univariado.

Resultados

Los genotipos observados para el codón 10 en los pacientes fueron TT 23%, TC 54% y CC 23%, y para los donantes 25%, 53% y 20%, respectivamente. Y, con respecto al codón 25, fueron GG 89% y GC/CC 11% en los receptores, y 91% y 9% en los donantes, respectivamente. Estas frecuencias fueron similares a las observadas en población control (N=120).

Enfermedad injerto vs. huésped aguda y crónica

La incidencia de EICHa fue de 44%, GII-IV 31% y GIII-IV 10%. En cuanto a EICHc, la incidencia fue del 35%: 18% limitado y 17% extenso. No se encontraron diferencias relevantes cuando se analizó la cohorte completa.

Cuando se analizó la cohorte de pacientes que recibió un acondicionamiento mieloblato, se encontraron diferencias significativas. En este subgrupo la incidencia de EICHa fue del 49%, GII-IV 38% y GIII-IV 10%. En relación al genotipo de los pacientes, se observó un incremento significativo en la incidencia de EICHa severo en los pacientes 10CC (GIII-IV 22% vs. 7.2%, $p=0.01$) no significativo en el AMV (HR 2.2, 95% CI 0.7-7.5, $p=0.18$). Con respecto al genotipo de los donantes, se encontró una tendencia a mayor incidencia de EICHa en los pacientes que recibieron un trasplante de un donante 10TT (62% vs.44%, $p=0.07$) sin diferencias significativas en la incidencias de las formas graves.

En el análisis de EICHc, la incidencia de esta complicación para el subgrupo de acondicionamiento mieloblato fue de 40%: 21% limitado y 19% extenso. El genotipo del receptor no mostró diferencias significativas en este evento, sin embargo los pacientes que recibieron un trasplante con donante 10CC presentaron un incremento significativo en la incidencia del EICHc extenso (32% vs 16%; AMV OR: 9, 95% CI 1.3-62; $p=0.02$).

Análisis de Sobrevida

La SG y MLE a 5 años de la cohorte completa fue de 51% y 15% respectivamente, la incidencia de recaída de 36% y la SLE de 46%. No se encontraron diferencias significativas en la cohorte completa.

El sub-análisis en la cohorte mieloblato mostró una SG y MLE a 5 años de 56% y 15%, una tasa de recaída de 33% y una SLE de 52%.

Los pacientes 10CC tuvieron un incremento significativo de la mortalidad al día 100 (19% vs. 7%, HR 3.2, 95% CI 1.01-10.2, $p=0.04$), mortalidad relacionada al trasplante a 1 año (29% vs. 7%, HR 7.1, 95% CI 1.3-37.1, $p=0.02$) y en MLE (1-5 años CC 28-32% vs. TC/TT 7-10%, Gray's test $p < 0.01$; HR 5.1, 95% CI 1.36-19.2, $p=0.01$) (figura 1), sin diferencias significativas en la SG.

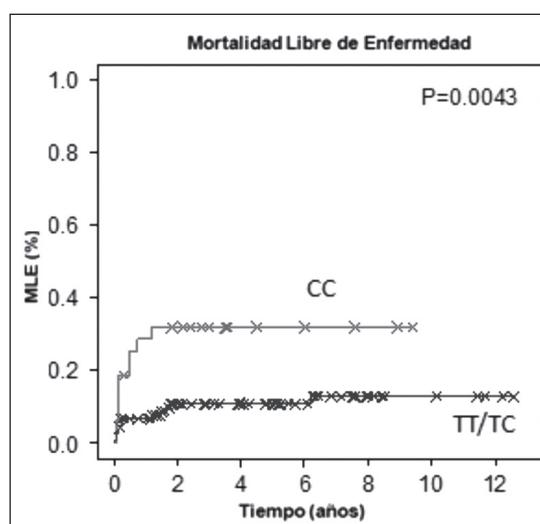


Figura 1. Pacientes 10CC vs. TT-TC tuvieron un incremento significativo de la MLE.

Al analizar las diferentes causas de mortalidad, los pacientes 10CC tuvieron un incremento significativo en la mortalidad por EICHa y síndrome de oclusión sinusoidal y no por infecciones (18% vs. 4%, 18% vs. 0% and 12% vs. 17% respectivamente,

$p < 0.01$).

Probablemente el hallazgo más relevante haya sido el del impacto del genotipo de los donantes.

Los receptores de donante 10TT presentaron un incremento significativo en la recaída (1-5 años TT 37-51% vs. TC 19-25% vs. CC 13-19%, Gray's test $p = 0.02$, HR 2.4, 95% CI 1.2-4.9, $p = 0.01$) (figura 2).

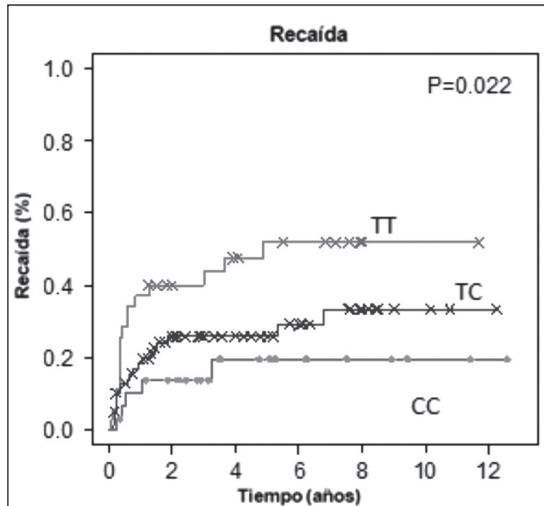


Figura 2. Donantes 10TT vs. TC vs. CC tuvieron un incremento significativo en la tasa de recaída.

Sin diferencias en la MLE, los donantes 10TT mostraron una tendencia a menor SLE (1-5 años 57-36% vs. 73-63%, log rank $p = 0.05$, HR 2.5, 95% CI 0.97-6.5 $p = 0.05$) (figura 3) y una reducción significativa en la SG (1-5 years TT 69-50% vs. TC/CC 77-69%, log-rank $p = 0.04$, HR 1.9, 95% CI 0.99-3.8, $p = 0.05$) (figura 4).

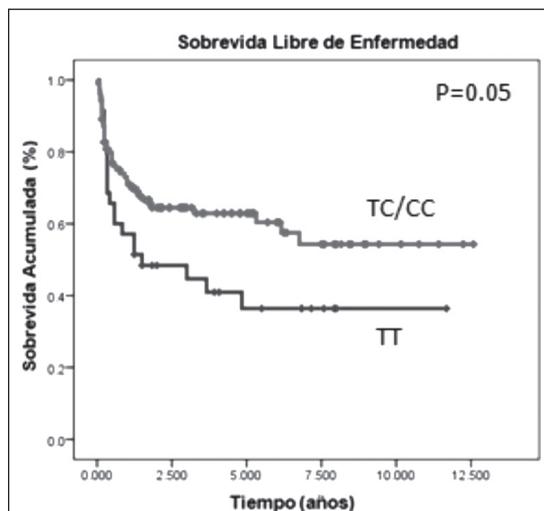


Figura 3. Donantes 10 TT vs. TC-CC tuvieron una disminución de la SLE.

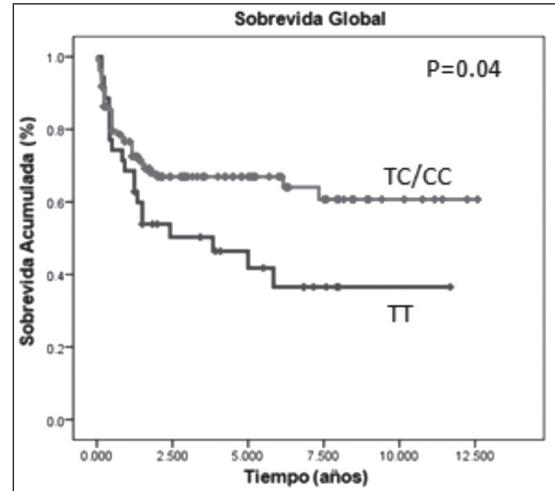


Figura 4. Donantes 10 TT vs. TC-CC tuvieron una disminución significativa de la SG.

No se encontraron diferencias significativas para ningún evento clínico asociado a la presencia de variantes en el codón 25.

Discusión y Conclusiones

El TACPH es el estándar de tratamiento para ciertas patologías de alto riesgo. La morbimortalidad asociada a este procedimiento sigue siendo considerable, principalmente asociado al EICH y a infecciones severas. Profundizar los conocimientos en las bases moleculares de estas complicaciones nos permitirá mejorar los resultados de este procedimiento y brindar a nuestros pacientes una mayor y mejor supervivencia.

Al igual que lo observado previamente en los TACPH NR, se observó que los pacientes 10CC tienen un incremento significativo en la MLE. La MLE en la presente serie de TACPH DR fue considerablemente menor a la observada previamente en TACPH NR18 (MLE 5 años 17% vs 41%, respectivamente), posiblemente esto explique por qué no se asoció a una disminución significativa en la SG.

El hallazgo más relevante se observa en el impacto del genotipo de los donantes. Quienes recibieron un trasplante de donante 10TT tuvieron un incremento en la incidencia de EICHa que no se acompañó de una reducción en la tasa de recaída sino lo contrario. Aun más importante, los donantes 10TT tuvieron una reducción significativa en la SG comparado con TC/CC. El hecho que el genotipo TT se asocie a mayor incidencia de EICHa y el CC se asocie a EICHc extenso puede explicarse con lo planteado

por Banovic y col quienes comunicaron en las etapas tempranas del trasplante una mayor producción de TGF- β 1, eventualmente asociada a 10CC, lo cual genera un ambiente inmunosupresor, con menor incidencia de EICHa pero llamativamente mayor efecto injerto vs. leucemia mientras que en las tardías se produce un ambiente profibrótico, con más EICHc extenso⁽¹⁹⁾.

Al igual que lo previamente observado por nuestro grupo en los TACPH NR, el impacto del polimorfismo fue significativo en el subgrupo de pacientes que recibió un acondicionamiento mieloablatoivo. Estos acondicionamientos dan origen a una “tormenta de citoquinas”⁽²⁰⁾. TGF-B1 es una citoquina clave en la regulación inmune y en el proceso fibrótico⁽⁶⁻⁹⁾. Por lo tanto, la presencia de polimorfismos funcionales, los cuales afectarían el proceso de secreción de esta citoquina de acuerdo a la hipótesis planteada, puede influir en el ambiente inflamatorio de este escenario y asociarse a los cambios clínicos observados.

En conclusión, los pacientes con genotipo 10CC tuvieron un incremento significativo de la MLE luego de un TACPH relacionado, hallazgo similar al análisis previo con donantes NR(18). Por otro lado, los donantes con genotipo 10TT podrían significar una peor selección comparado con los TC/CC debido a su asociación con mayor recaída y la reducción en la SG. Si bien son necesarios estudios prospectivos para confirmar nuestros hallazgos, estos resultados enfatizan la importancia de estudios funcionales del TGF- β 1 en el trasplante de CPH. La identificación de estos SNP pre trasplante podría contribuir con la selección adecuada de los regímenes de acondicionamiento e inmunosupresión así como también del donante ideal. Ésta es la cohorte más numerosa estudiada para polimorfismos de TGF-B1 en trasplante alogénico relacionado hasta el presente, siendo la primera en demostrar su impacto en el curso clínico de este procedimiento.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés

Bibliografía

1. Gratwohl A. Risk assement in haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20(2):119-124
2. Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20(2):155-70.
3. Dickinson AM. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20(2):189-207.
4. Rocha V, Franco R, Porcher R, et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcome after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2002 Dec; 100(12):3808-3918.
5. Chien J, Zhamg X, Fan W, et al. Evaluation of published single nucleotide polymorphism associated with acute GVHD. *Blood* 2012 May;119(22):5311-5319.
6. Bommireddy R, Doetschman T. TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med.* 2007 Nov;13(11):492-501.
7. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008 Aug;134(3):392-404.
8. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001 Sep 3;194(5):629-44.
9. Savage ND, de Boer T, Walburg KV, et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):2220-6.
10. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983 Jun 10;258(11):7155-60.

11. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*. 1985 Aug 22-28;316(6030):701-5.
12. Suthanthiran M, Li B, Song J, et al. Transforming growth factor- β 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *PNAS*. 2000 Mar;97(7):3479-3484.
13. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factor-beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003 May 15;63(10):2610-5.
14. Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2002 Feb;316(1-2):83-94.
15. Berro M, Mayor N, Maldonado-Torres H, et al. Association of functional polymorphism of the transforming growth factor B1 gene with survival and graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2010 feb;95(2):276-283.
16. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, et al. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Nov;30(10):665-71.
17. Noori-Dalooi M, Rashidi-Nezhad A, Izadi P, et al. Transforming growth factor- β 1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogeneic BMT in Iranian population. *Ann Transplant*. 2007 Dec;12(4):5-10.
18. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, et al. AR-MS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol*. 1999 Jun;7(2):127-8.
19. Banovic T, MacDonald K, Morris E, et al. TGF- β in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe. *Blood*. 2005 Sept;106(6):2206-2214..
20. Melenhorst JJ, Tian X, Xu D, et al. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuation after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2012;97(6):867-873.