UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Jordana Braga

Impacto do loco HLA-DPB1* em pacientes consanguíneos submetidos à
transplantes de células tronco hematopoiéticas

Ribeirão Preto

2014

Jordana Braga

Impacto do loco HLA-DPB1* em pacientes consanguíneos submetidos à
transplantes de células tronco hematopoiéticas

Ribeirão Preto

2014

Jordana Braga

Impacto do loco HLA-DPB1* em pacientes consanguíneos submetidos à
transplantes de células tronco hematopoiéticas

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas.

Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Belinda Pinto Simões

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de documentação

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Braga, Jordana.

Impacto do loco HLA-DPB1* em paciente consanguíneos submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas/ Jordana Braga; orientadora Belinda Pinto Simões - Ribeirão Preto, 2014.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2014.

Nome: Braga, Jordana.

Título: Impacto do loco HLA-DPB1* em paciente consanguíneos submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais,
Que sempre foram e são meu porto seguro e fonte de incentivo constante, que me ensinaram a importância e o valor do conhecimento e dos estudos. Amor maior

A minha irmã,
Minha melhor amiga

Ao meu marido Simão,
Pelo apoio, compreensão e paciência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar Voltarelli pelo exemplo de profissional, de determinação e superação, por ser o primeiro a me apoiar neste meu sonho e a me abrir as portas.

A Prof.^a Dra. Belinda, pelo acolhimento, compreensão e carinho que me recebeu. Agradeço por toda a orientação científica, ensinamentos de informática, foi muito enriquecedor conhecer e receber orientações de uma profissional tão competente e humildade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi pelas orientações, explicações e direcionamento.

A Prof.^a Dra. Noemi Pereira Farah pelas orientações, ajuda e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Celso Teixeira pela paciência e colaboração nas análises estatísticas.

A Dra. Cássia por proporcionar-me o primeiro contato com a imunogenética.

A Dra. Marcia Melo pelo carinho e auxílio.

Ao Departamento de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto. Ao secretário Emerson Quirino e a Marta Leoni pela atenção, carinho e auxílio quanto aos assuntos burocráticos.

A toda minha equipe pela colaboração e cobertura na minha ausência.

RESUMO

O requisito fundamental na seleção do par doador-receptor em Transplantes de Medula Óssea (TMO) é regido pelo sistema do Complexo Principal de Histocompatibilidade, ou seja, pelos mecanismos imunológicos mediados pelas moléculas dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). No entanto as incompatibilidades HLA, podem influenciar de forma negativa ou positiva os resultados dos transplantes, através da Doença do Enxerto versus Hospedeiro e o efeito do enxerto versus Leucemia (EvL) respectivamente. Ainda é desconhecido o impacto do locus HLA-DPB1* neste contexto. Assim o presente projeto tem como objetivo a avaliação do impacto do HLA-DPB1* em transplantes de pacientes consanguíneos e a ocorrência de DECH. Para a tal finalidade, tipificamos o locus em questão utilizando a metodologia PCR-SSO, onde após a reação de amplificação da cadeia pela polimerase, realizamos a hibridização com uma sequência específica de oligonucleotídeos para tipificação do Loco HLA-DPB1*. Foram analisadas 826 amostras, sendo 413 pares de receptores e seus respectivos doadores familiares, submetidos a Transplantes de Células Tronco Hematopoiéticas, realizados na Unidade de Transplante de Medula Óssea de Curitiba da Universidade Federal do Paraná e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. Observou-se que a presença de incompatibilidades HLA-DPB1* aumentam a chance dos receptores desenvolverem a doença do enxerto versus hospedeiro aguda, em graus mais graves. Assim, concluímos que a avaliação deste loco pode prevenir esta doença, e caso não haja outro doador, alerta o clínico quanto à utilização de medidas profiláticas.

Palavras-chaves: Transplante de Medula Óssea, Complexo Maior de Histocompatibilidade, HLA-DPB1*, Doença do Enxerto versus Hospedeiro.

Abstract

The key requirement in the selection of the receptor-donor pair for bone marrow transplant is defined by the Major Histocompatibility Complex, or by immunologic mechanisms mediated by molecules of the Human Leukocyte Antigens (HLA). However the post transplant complications due to HLA mismatches, as Graft versus Host Disease (GVHD) and graft failure are fundamental to the success of these transplants. Still unknown is the impact of loci HLA -DPB1*, so this project aims to assess the impact of HLA - DPB1* in transplant patients consanguineous and assessing the impact of incompatibilities in HLA - DPB1 * GVHD. For this purpose, analyzed the loco in question using the PCR-SSO method, where after the amplification reaction polymerase chain, we performed hybridization with a sequence -specific primers for typing of HLA - DPB1* Loco. We analyzed 826 samples, 413 pairs of recipients and their respective donors, patients undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplants performed in the Unit for Bone Marrow Transplantation in Curitiba, Federal University of Paraná and the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP. It was observed that the presence of mismatches HLA- DPB1* increase the chance of recipients develop chronic graft versus host disease, in more severe degrees. Thus, we conclude that the evaluation of this loci can prevent this disease and if no other donors alert the clinician to the use of prophylactic measures.

Keywords: Bone Marrow Transplantation, Major Histocompatibility Complex, HLA-DPB1 *, Graft versus host disease.

Listas de Abreviaturas e Siglas

AAG	Anemia Aplástica Grava
ASS	Anemia Aplástica Severa
CIBMTR	Center for International Blood & Marrow Transplant Research
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DECH	Doença do enxerto versus hospedeiro
DECH-a	Doença do enxerto versus hospedeiro aguda
DECH-c	Doença do enxerto versus hospedeiro crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EvL	Efeito do enxerto versus hospedeiro
GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HPN	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
IMGT/HLA	Banco de dados da nomenclatura oficial do sistema HLA
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMMJ	Leucemia Mielomonocítica Juvenil
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SCID	Imunodeficiência Grave Combinada

SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SSO	Sequência Específica de Oligonucleotídeo
SSOP	Sondas de sequência específica de oligonucleotídeos
REDOME	Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea
REREME	Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de células tronco-hematopoiéticas
TMO	Transplante de Medula Óssea
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Resultados da compatibilidade do loco HLA-DPB1 na análise retrospectiva de 8.539 transplantes apresentados ao Grupo de Trabalho Internacional de Histocompatibilidade. (Fonte: FLEISCHHAUER, et al, 2012)	36
Gráfico 2- Descrição das doenças de base dos receptores do estudo. (fonte: gráfico elaborado pela autora).....	40
Gráfico 3- Perfil dos receptores quanto ao grau da DECHa. (Fonte: elaborado pela autora)	41
Gráfico 4- Perfil dos receptores quanto a severidade da DECHc.....	42
Gráfico 5- Porcentagem das compatibilidades e incompatibilidades encontradas (Fonte: gráfico elaborada pela autora).....	50
Gráfico 6- O acometimento da DECH nos pacientes transplantados foi de 40,12%, sendo 22,51% de DECHc e 17,67 de DECHa. (Fonte: gráfico elaborada pela autora)	53

Lista de tabelas

Tabela 1- Classificação clínica da DECH aguda.....	20
Tabela 2- Graduação da DECH aguda (Fonte: Paton, E.J.A; Coutinho, M.A.; Voltarelli, J.C. 2000 (15))20	
Tabela 3- Classificação dos alelos HLA-DPB1* conforme sua predição de imunogenicidade. Com base no padrão de reconhecimento de células T descrito neste estudo, os grupos foram divididos em: imunogênico (grupo 1), intermediário (grupo 2) ou pouco imunogênico(grupo3).....	33
Tabela 4- Classificação das incompatibilidades HLA-DPB1* como permissivas ou não permissivas na DECH é indicada para todas as possíveis combinações.	34
Tabela 5- Resultados observados nos receptores.....	41
Tabela 6- Especificações das quantidades necessárias da amostra e dos reagentes.	43
Tabela 7- Programação dos ciclos de trabalho do termociclador.....	43
Tabela 8- Preparo dos reagentes necessários para a hibridização.	45
Tabela 9- Preparo da SAPE.....	45
Tabela 10- BEADS testadas e seus respectivos grupos e alelos específicos.....	47
Tabela 11- Resultados analisados do grupo 1.....	50
Tabela 12- resultados analisados do grupo 2.....	50
Tabela 13- Descrição dos graus da DECHa encontrados nos grupos incompatíveis.....	51
Tabela 14- Representação dos alelos encontrados com suas respectivas quantidades e frequências, comparadas às frequências relatadas no site allele frequency.	55
Tabela 15- Frequência dos alelos HLA-DPB1* encontrados nos respectivos países relacionados.	56

Lista de figuras

Figura 1- Fisiopatologia da DECH aguda	19
Figura 2-Fisiopatologia da DECHc.....	22
Figura 3- Efeito enxerto versus leucemia (EVL). TGI= trato gastrointestinal, DECH= doença do enxerto versus hospedeiro	24
Figura 4-Representação esquemática do cromossomo 6 humano, com as regiões do complexo de histocompatibilidade e o sistema gênico HLA. Em laranja está representada a região de classe I, em azul a região de classe II e em verde a região de classe III. (24).....	26
Figura 5-Estrutura de uma molécula HLA de classe I. (Fonte: ABBAS e LITCHMAN, 2005)	27
Figura 6- Estrutura da molécula de classe II. (Fonte: ABBAS e LICHTMAN 2005).	28
Figura 7- Número de alelos descritos até 2013. (Fonte: Disponível em: http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png . Acesso em: 15/09/2013.).....	30
Figura 8- Caracterização quanto ao sexo dos doadores. Do total de doadores, 232 eram do sexo masculino e 181 do sexo feminino; no grupo com 64 incompatibilidades doadores do sexo masculino foram 39 para 25 doadores do sexo feminino; e no grupo que considerou as incompatibilidades não permissivas foram 12 doadores do sexo masculino e 11 do sexo feminino (Fonte: Figura elaborada pelo autor).....	40

Sumário

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	25
LISTA DE GRÁFICOS	27
LISTA DE TABELAS	28
LISTA DE FIGURAS	29
1.0 INTRODUÇÃO	16
DOENÇA DO ENXERTO VERSUS O HOSPEDEIRO.....	18
DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO AGUDA DECHA	19
DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO CRÔNICA DECHc.....	21
EFEITO DO ENXERTO VERSUS LEUCEMIA	22
COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH)	24
MHC E TRANSPLANTES	25
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO MHC HUMANO.....	25
PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS E ESTRUTURA DO MHC.....	26
<i>HLA Classe I:</i>	26
<i>HLA Classe II:</i>	28
<i>HLA Classe III:</i>	29
O SISTEMA HLA	29
DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	31
INCOMPATIBILIDADES NO SISTEMA HLA	32
INCOMPATIBILIDADES PERMISSIVAS E NÃO PERMISSIVAS.....	32
ALGORITMO	33
LOCUS HLA-DP.....	37
OBJETIVOS	38
GERAL	38
ESPECÍFICOS	38
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	39
CASUÍSTICA.....	39
<i>O perfil dos receptores quanto a quantidade de casos de acometimento da DECHa pode ser visualizado no gráfico 3, onde NI é a quantidade de casos não informado para este parâmetro. Pode também ser verificado a quantidade e o perfil dos receptores quanto a severidade da DECHc no gráfico 4.</i>	<i>41</i>
TIPIFICAÇÕES HLA	42
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

Transplante é o processo terapêutico de retirada de células, tecidos ou órgãos, chamados de enxerto, e seu transplante em um indivíduo diferente. O enxerto que ocorre entre indivíduos diferentes da mesma espécie é denominado de aloenxerto. Porém, uma grande limitação ao êxito dos transplantes é a resposta imune entre o receptor e o doador, a qual pode resultar em rejeição quando o enxerto é reconhecido como estranho pelo sistema imune do receptor. (1). Foi com a descrição do sistema de histocompatibilidade que os resultados dos transplantes começaram a ter sucesso e consequentemente sendo um grande avanço. A necessidade de elucidação e conhecimento do impacto do sistema HLA na sobrevivência de órgãos e tecidos transplantados motivou o estudo dos genes e proteínas deste sistema. Os produtos antigênicos das moléculas HLA são os principais determinantes da aceitação ou rejeição de órgãos e tecidos em transplantados. (2)

Atualmente a literatura médica credits ao cirurgião Jacques-Louis Reverdin (1842-1928) o primeiro transplante com sucesso em humanos, contudo, contos mitológicos e relatos religiosos sugerem que os transplantes são uma prática bem mais antiga. A partir das tentativas de transplantes entre diferentes espécies, foram sendo desvendados os conhecimentos acerca das reações sorológicas entre os indivíduos. A segunda guerra contribuiu para o avanço no campo da antibioticoterapia, nas transfusões sanguíneas, e na utilização dos analgésicos os quais estimularam o desenvolvimento nesta área. A comprovação de que a identidade genética evitava a rejeição ocorreu em 1954, quando foi realizado com sucesso o primeiro transplante entre gêmeos univitelínicos. (2)

Os aloantígenos são as moléculas reconhecidas como estranhas pelo sistema imune, e os linfócitos que reagem contra estes denominados de linfócitos

alorreativos. A principal função dos linfócitos B é a síntese/produção de anticorpos. A principal função dos linfócitos T é a defesa contra aloantígenos e ativação de outras células de forma direta ou indireta. Esta função especializada de apresentação dos antígenos é desempenhada por proteínas codificadas em um loco denominado de complexo principal de histocompatibilidade. (1).

O transplante de células-troncos hematopoiéticas (TCTH) ou de medula óssea (TMO) é indicado no tratamento de doenças hemato-oncológicas, doenças hereditárias, doenças imunológicas e doenças hematológicas benignas. Os transplantes são caracterizados de singênico, alogênico, autogênico na dependência do doador escolhido:

 singênico - irmão gêmeo;

 alogênico: relacionado ou aparentado (irmão ou familiar);

 não-relacionado ou não aparentado (não familiar);

 autólogo ou autogênico (medula óssea originária do próprio paciente com ou sem tratamento in vitro).

As fontes das células tronco hematopoiéticas podem ser de medula óssea (MO), sangue periférico ou cordão umbilical. Encontrar uma célula tronco hematopoiética com padrão ideal de compatibilidade é essencial para o sucesso do transplante. Devido aos padrões de segregação dos genes a compatibililidade ideal para os locus HLA entre irmãos é de 25% para cada irmão, sendo influenciada pelo número de irmãos. Assim quanto maior as famílias, maior a probabilidade de se encontrar um doador HLA compatível. Vários fatores estão associados às complicações dos transplantes. A disparidade genética é um dos fatores mais importantes e a morbidade do procedimento aumenta proporcionalmente às disparidades genéticas relacionadas ao locus HLA. Entre as complicações mais relacionadas à disparidade HLA podemos citar a rejeição do enxerto e a doença do enxerto versus hospedeiro. (3)

Quando não há um doador na família a busca no Brasil é realizada no REDOME-Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea, um banco de cadastro de possíveis doadores não aparentados. Este sistema é gerenciado pelo Instituto

Nacional do Câncer (INCA), onde estão localizadas as informações de identificação dos possíveis doadores e os resultados de suas características genéticas para os principais locus HLA utilizados nos processos de transplante. O sistema possibilita, através do SISMATCH, o cruzamento dos resultados dos receptores Inscritos no REREME (Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea) com os doadores cadastrados no REDOME para verificação do grau de compatibilidade entre eles. (Fonte: <http://www.sbtmo.org.br/redome.php>)

Doença do Enxerto Versus o Hospedeiro

A Doença do enxerto versus o hospedeiro é sem dúvida a complicação mais temida do TMO. É responsável por parte da morbidade e mortalidade do procedimento.(4) Para a ocorrência da DECH precisa haver um receptor imunologicamente deprimido, a infusão de um enxerto imunologicamente ativo e uma disparidade suficiente para doador e receptor serem reconhecidos como diferentes. Vários são os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da DECH: a doença de base, o grau de incompatibilidade HLA entre o doador e receptor, a idade avançada, a involução do timo e a fatores imunológicos de sensibilização prévia CORREA, 2008.(5;6;6;7)

Do ponto de vista imunológico a DECH ocorre quando o complexo de histocompatibilidade do hospedeiro reconhece os linfócitos T ativados da medula transplantada, assim os linfócitos T da medula reconhecem como estranho os antígenos do hospedeiro atacando os tecidos do mesmo.(8;9)

São descritas duas formas da DECH: a DECH aguda e a DECH crônica, antigamente diferenciadas apenas pelo momento em que os sintomas se iniciavam: era chamada de aguda quando ocorria antes de 100 dias do transplante e crônica após os 100 dias. (10;11). Novos critérios para o diagnóstico da DECH foram sendo adotados, priorizando o tipo de lesão, a extensão e a gravidade para cada órgão ou sítio acometido, e não somente pelo tempo de aparecimento dos sintomas. (12).

Uma análise recente do CIBMTR - Center for International Blood & Marrow Transplant Research em pacientes transplantados com neoplasias hematológicas,

principalmente com células de medula óssea, verificou-se um risco aumentado de DECH agudo em enxertos com uma incompatibilidade antigênica HLA-A, B, C e DRB1, ou disparidades alélica. (13)

Doença do enxerto versus hospedeiro aguda DECHa

A DECH aguda é caracterizada como uma síndrome composta por hepatite, dermatite e enterite ocorrendo até 100 dias após o transplante, classificada em graus sendo a graduação 0,I,II,III e IV. (14).

Segundo Billingham em 1966, para diagnosticar a DECH-a são necessários:

- Que o enxerto contenha células imunologicamente competentes;
- Que o receptor possua antígenos faltantes no doador e que estes antígenos sejam reconhecidos como estranhos;
- Que o receptor seja incapaz de produzir uma reação imunológica eficaz contra as células do doador.

A fisiopatologia da DECH aguda está esquematizada na figura 1.

Figura 1- Fisiopatologia da DECH aguda

A evolução e a graduação da DECH determinam a evolução e prognóstico da doença, além de orientar a abordagem terapêutica indicada. Os critérios de

caracterização consideram os exames clínicos e histopatológicos. A graduação clínica considera a porcentagem de superfície corporal acometida devido ao envolvimento cutâneo, as dosagens de bilirrubinas, e o volume de diarreia diária. As tabelas 1 e 2 descrevem a graduação clínica e o estadiamento. (15)

Tabela 1- Classificação clínica da DECH aguda.

Grau/Estágio	Pele	Fígado	Intestino	Distúrbio Funcional
0 (nenhum)	0	0	0	0
I (leve)	+ a ++	0	0	0
II (moderado)	+ a +++	+	+	+
III (grave)	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++
IV (com risco de vida)	+ a ++++	++ a ++++	++ a ++++	+++

(Fonte: AZEVEDO, 2010)

Tabela 2- Graduação da DECH aguda (Fonte: Paton, E.J.A; Coutinho, M.A.; Voltarelli, J.C. 2000 (15))

Estágio	Pele	Fígado	Trato gastrointestinal
0	Sem "rash" cutâneo	Bilirrubina <2mg/dl	Diarréia < 500ml/dia
+	"Rash maculopapular <25% da superfície corporal	Bilirrubina de 2 a 3 mg/dl	Diarréia 500 a 1000ml/dia ou náuseas persistentes
2+	"Rash maculopapular em 25 a 50% da superfície corporal	Bilirrubina de 3 a 6 mg/dl	Diarréia de 1000 a 1500ml/dia
3+	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina de 6 a 15 mg/dl	Diarréia > 1500ml/dia
4+	Bolhas e descamação	Bilirrubina >15 mg/dl	Dor abdominal +/- íleo paralítico

Os fatores abaixo relacionam-se ao maior desenvolvimento da DECHa e também influenciam a gravidade da doença:

- Doadores não aparentados
- Disparidades HLA
- Doador feminino e receptor masculino,
- Aumento da idade dos doadores e dos receptores.
- Fonte de células-tronco hematopoiéticas de sangue periférico.

Os fatores que estão relacionados a menor incidência de DECHa são:

- A criopreservação da medula óssea antes de sua infusão, aparentemente depletam as células alorreativas, reduzindo a taxa do DECHa.
- Fonte de células de sangue de cordão umbilical. (14)

Classicamente a DECH está relacionado a alorreatividade das células T do doador contra os tecidos do receptor, porém a gravidade da DECHa é iniciada pelas citocinas inflamatórias decorrentes da toxicidade do regime de condicionamento e à integridade das mucosas. Os efeitos das citocinas inflamatórias do regime de condicionamento contribuem para o aumento das taxas de DECH hiperagudo, sendo um importante fator de risco. Porém, o fator de risco significativo de ocorrência da DECH são as incompatibilidades HLA. Kim et al e Powles et al descreveram ocorrências severas da DECH hiperaguda em transplantes haploidênticos.(16)

Doença do enxerto versus hospedeiro crônica DECHc

Em 1980, baseados em dados de vinte pacientes foi classificada a DECH crônica, com os critérios utilizados atualmente. Assim, a doença foi classificada como:

Limitada - comprometimento localizado de pele e/ou fígado;

Extensa -comprometimento generalizado de pele ou doença limitada associada ao comprometimento de outros órgãos.

A fisiopatologia da DECH crônica está esquematizada na figura 2.

Figura 2-Fisiopatologia da DECHc

Apesar de menos conhecida e estudada a fisiopatologia da DECH crônica parece envolver a liberação de linfócitos T alorreativos a partir do timo e produção de anticorpos. Ela em vários aspectos assemelha-se a uma doença autoimune.

Efeito do Enxerto versus leucemia

Estudos clínicos demonstraram que a alorreatividade após o transplante de células tronco hematopoiéticas podem ocasionar o efeito benéfico do enxerto versus o hospedeiro e, não somente a DECH.

Em transplante de células tronco hematopoiéticas com condicionamento não mieloablativo ou após infusão de linfócitos do doador, pode ocorrer o efeito do enxerto versus leucemia (EvL). Este mecanismo é importante para eliminar as células leucêmicas residuais, contribuindo para a cura de pacientes com leucemia refratária e outras doenças malignas hematológicas. Este efeito é decorrente da capacidade das células imunes do doador em reconhecer e eliminara as células leucêmicas residuais no receptor após o transplante. O efeito enxerto versus leucemia ocorre apenas em transplantes alogênicos, onde os linfócitos T do doador reconhecem os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade do receptor, dependendo do grau de incompatibilidade entre eles. (17-19). Nada mais é

do que uma doença do enxerto contra o receptor dirigida ao tecido tumoral (vide figura 3).

Evidências que células alorreativas responsáveis pelo DECH podem também ser responsáveis pelo EvL, levou ao estudo celular que identificou a morte específica dos blastos leucêmicos através do reconhecimento do HLA-DPB1*. Observou-se que 70% dos doadores não relacionados que eram compatíveis para os locus HLA-A,-B e -DR, eram incompatíveis para HLA-DPB1*. Ibisch e colaboradores em 1999 demonstraram que células leucêmicas, com compatibilidade para HLA-A, -B, -DR e -DQ e incompatíveis para HLA-DPB1* sofreram lise. Observou-se que os alelos HLA-DPB1*04:01, HLA-DPB1* 0402, HLA-DPB1* 01:01,HLA-DPB1* 02:01, HLA-DPB1* 03:01 são mais frequentes. (20)

Em muitos dos transplantes alogênicos os regimes de condicionamento tem como objetivo a destruição de células tumorais, visando à cura da doença de base; destruição do sistema imunológico do receptor/paciente; e criação de um ambiente para enxertia das células transplantadas. A imunorreconstituição, após o transplante de células tronco hematopoiéticas, caracterizada por um quimerismo do doador, precede a uma alorreatividade no receptor, o que pode contribuir para uma DECH ou uma regressão da doença devido ao efeito EvL. (21). Há 40 anos o transplante de células tronco hematopoiéticas é utilizado para o tratamento e cura de diversas doenças e patologias já mencionadas, o efeito do enxerto versus leucemia, ou enxerto versus tumor é responsável pela eliminação eficaz da doença de base. (22)

Em muitos dos transplantes alogênicos os regimes de condicionamento tem como objetivo a destruição de células tumorais, visando à cura da doença de base; destruição do sistema imunológico do receptor/paciente; e criação de um ambiente para enxertia das células transplantadas. A imunorreconstituição, após o transplante de células tronco hematopoiéticas, caracterizada por um quimerismo do doador, precede a uma alorreatividade no receptor, o que pode contribuir para uma DECH ou uma regressão da doença devido ao efeito EvL. (21). Há 40 anos o transplante de células tronco hematopoiéticas é utilizado para o tratamento e cura de diversas doenças e patologias já mencionadas, o efeito do enxerto versus leucemia, ou enxerto versus tumor é responsável pela eliminação eficaz da doença de base. (22)

Figura 3- Efeito enxerto versus leucemia (EVL). TGI= trato gastrointestinal, DECH= doença do enxerto versus hospedeiro.

Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ou MHC (Major Histocompatibility Complex) é uma região presente no genoma de todos os vertebrados onde estão localizados genes altamente polimórficos e polialélicos. Esses genes são expressos de forma codominante como moléculas de superfície celular, em todas as células nucleadas, e estão relacionados às respostas imunes. Em seres humanos este sistema gênico é denominado de sistema de antígenos leucocitários humano, ou sistema HLA. Está localizado no cromossomo 6, na região 6p21.3 e é constituído por moléculas de fundamental importância na apresentação de antígenos e patógenos aos Linfócitos T. (1)

Durante a resposta imune, as moléculas expressas na superfície que foram codificadas pelo MHC interagem com as células do sistema imune. Para que ocorra o reconhecimento a antígenos estranhos é necessário que estes antígenos sejam apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), ligados às moléculas de MHC próprias, e transportadas na superfície celular. (23).

O rim foi o primeiro órgão a ser transplantado em seres humanos. Os insucessos iniciais foram atribuídos a processos imunológicos. A melhoria nas técnicas de transfusão e especialmente os experimentos com enxertos de pele elucidaram vários dos mecanismos responsáveis pela rejeição ou não dos enxertos. Em ratos submetidos a dois transplantes de pele demonstrou-se que a rejeição a um segundo enxerto ocorria mais rapidamente, sugerindo que as “células do corpo são capazes de discernir, de uma maneira qualitativa as diferenças bioquímicas nas células de outros indivíduos”. (2)

Quando um órgão ou tecido é transplantado de um ser a outro, há duas possibilidades: ou o organismo reage bem, reconhecendo como seu o enxerto, ou ele é rejeitado sendo destruído pelo sistema imunológico. Esses genes de histocompatibilidade são herdados, e seu polimorfismo é determinante no reconhecimento da compatibilidade entre o próprio e o estranho. (1)

MHC e Transplantes

Os genes do MHC responsáveis pelo reconhecimento do enxerto como semelhante ou geneticamente distinto do hospedeiro foram chamados de genes de histocompatibilidade. O reconhecimento da compatibilidade e as diferenças entre o próprio e não próprio foram atribuídas ao grande polimorfismo deste sistema. A elucidação do polimorfismo é essencial para o entendimento deste sistema. Alguns genes apresentam sequências constantes em todos os seres de uma espécie. Quando formas alternativas ou variantes desses genes estão presentes em frequências estáveis e maior que 1% são denominados genes polimórficos. (1)

Organização genômica do MHC Humano

Os genes do MHC localizam-se no braço curto do cromossomo 6 e são os genes que apresentam maior polimorfismo do genoma humano (Figura 4). São expressos de forma codominante nos indivíduos, ou seja, ambos os alelos herdados dos progenitores são expressos simultaneamente. O conjunto de alelos é denominado

de haplótipo, e cada gene HLA recebe uma designação numérica. O MHC é dividido em três regiões classe I, classe II e classe III. Sendo que as duas primeiras classes codificam grupos de proteínas estruturalmente distintas, porém homólogas, que apresentam peptídeos aos linfócitos T CD8+ e TCD4+ respectivamente. (1)

Figura 4-Representação esquemática do cromossomo 6 humano, com as regiões do complexo de histocompatibilidade e o sistema gênico HLA. Em laranja está representada a região de classe I, em azul a região de classe II e em verde a região de classe III. (24)

Propriedades das proteínas e estrutura do MHC

HLA Classe I:

A classe I localiza-se na porção mais telomérica do MHC no cromossomo, compreendendo cerca de 1.800Kb apresentando mais de 122 locus, sendo que

cerca de 41 expressam a proteína funcional (25). As proteínas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas, e realizam a apresentação dos peptídeos aos linfócitos T CD8+. Os genes desta classe são divididos em clássicos HLA-A, HLA-B e HLA-C, não clássicos HLA-E, HLA-F, e HLA-G (24) e pseudogenes HLA-H, HLA-J, HLA-K e HLA-L. (26)

As moléculas de classe I são heterodímeros formados por duas cadeias polipeptídicas alfa constituídas por três subdomínios extracelulares ligadas de forma não-covalente. Além das subunidades alfa, que são codificadas pelo MHC o HLA de classe I, possui uma subunidade denominada de β 2-microglobulina não codificada pelo MHC e sim pelo cromossomo 15 (Figura 5). Três quartos da cadeia alfa são extracelulares e possuem um pequeno segmento hidrofóbico que atravessa a membrana celular. Os resíduos da região carboxi-terminal localizam-se no citoplasma. A fenda de ligação das moléculas de classe I é constituída por duas alfas hélices paralelas com extremidades fechadas podendo acomodar peptídeos contendo de 8 a 11 aminoácidos. Os polimorfismos destas moléculas são confinados aos domínios α 1 e α 2 onde contribuem para as variações na ligação dos peptídeos e no reconhecimento dos alelos pelas células T. O domínio α 3 é constante em todas as moléculas classe I, e sua importância deve-se a ser o local de ligação ao CD8. (1).

Figura 5-Estrutura de uma molécula HLA de classe I. (Fonte: ABBAS e LITCHMAN, 2005)

HLA Classe II:

Os genes da classe II localizam-se na região mais centromérica do MHC, estendendo-se em 700kb e já tendo sido descritos 34 locus divididos em clássicos: HLA-DQ, HLA-DP e HLA-DR; e não clássicos: HLA-DM e HLA-DO. (24).

Essas moléculas também são heterodímeros, ligadas de forma não covalente e constituídas por duas cadeias polipeptídicas, cadeias alfa (subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e as cadeias beta (subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$) Figura 6, seguidas por uma porção hidrofóbica transmembrânica e uma cauda hidrofílica intracelular. O peptídeo se acomoda na fenda de ligação entre as cadeias $\alpha 1$ e $\beta 1$, sendo as duas subunidades codificados pelos genes do MHC A e B respectivamente. No HLA classe II a cadeia beta apresenta o maior polimorfismo. (1)

Figura 6- Estrutura da molécula de classe II. (Fonte: ABBAS e LICHTMAN 2005).

As moléculas da classe II estão presentes nos linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (APCs) e apresentam peptídeos aos linfócitos T CD4+. Os peptídeos apresentados aos linfócitos CD4+ são peptídeos derivados de microrganismos e proteínas extracelulares. A molécula de classe II, assim como a de classe I completa

são heterodímeros das cadeias alfa e betas e suas funções dependem da ligação de um peptídeo à fenda entre outros fatores. (1)

HLA Classe III:

Esta região estende-se por cerca de 900kb, localizando-se entre as regiões de classe I e classe II e é responsável por codificar mais de 70 polipeptídeos diferentes. Os genes desta região codificam moléculas de citosinas (LT α , LT β e TNF) e as moléculas relacionadas ao sistema complemento (C2, C4A, C4B). (1)

O Sistema HLA

O reconhecimento de novos alelos e o desenvolvimento nesta área originou há 14 anos um banco de dados especializado, o Banco de dados da nomenclatura oficial do sistema HLA (IMGT/HLA), onde pesquisadores anualmente analisam as publicações e atualizações da nomenclatura do Sistema HLA. Assim a “descoberta” é acessível ao público, bem como a análise dos alelos e as informações da sequência. Com a colaboração do Cancer Research UK e European Bioinformatics Institute (EBI), foi desenvolvido o Oracle, que permite aos pesquisadores consultas complexas sobre a sequência, suas características, referências e denominações de alelos através de uma interface gráfica pelo usuário na web. O IMGT/HLA é parte de um projeto de imunogenética internacional, que inclui as sequências oficiais pelo comitê de nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (OMS).(27)

Ao IMGT/HLA são endereçadas submissões de trabalhos de todo o mundo, é analisado e se cumprirem os requisitos é dado à designação oficial do novo alelo pelo Comitê de Nomenclatura da OMS do Sistema HLA. O crescimento do conhecimento dos alelos neste campo pode ser visualizado na Figura 7. Cerca de 3% das submissões são rejeitadas, há necessidade de publicação rápida dos novos alelos, o que disponibiliza as informações rapidamente para consultas. Portanto, as informações, consultas da sequência dos alelos, proteínas, alinhamento entre outros, são disponibilizados no site <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/citations.html>. (27)

Figura 7- Número de alelos descritos até 2013. (Fonte: Disponível em: http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png. Acesso em: 15/09/2013.)

A importância da compatibilidade entre os locus HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 já estão bem estabelecidas no processo de escolha de um doador, porém mesmo com a compatibilidade destes genes são observadas as complicações descritas acima no pós-transplante de medula óssea. Outros fatores também contribuem juntamente com a disparidade HLA para as complicações pós TMO como a idade do paciente, a toxicidade relacionada ao condicionamento, o tipo e fase da doença, infecções e a compatibilidade. (2)

A seleção do doador com um grau adequado de compatibilidade é uma característica essencial para o sucesso dos transplantes, sendo o sistema HLA um dos fatores genéticos com maior influência no resultado dos transplantes. Devido ao seu extenso polimorfismo, e a evolução no pós-transplante o reconhecimento da alogenicidade levou a necessidade da identificação das variantes alélicas e de seus produtos nos pares de receptores e potencialmente doadores essas informações possibilita uma escolha mais criteriosa dos doadores. Assim, nos últimos anos, têm sido reavaliados os genes e alelos HLA clássicos envolvidos no TCTH. (28)

Desequilíbrio de Ligação

Desequilíbrio de ligação é quando alelos de diferentes locos ocorrem em uma frequência maior que a esperada em uma população, ou seja, é um fenômeno de associação não aleatória. (29) O desequilíbrio de ligação acontece quando a frequência de um dado alelo em um mesmo haplótipo difere da frequência haplotípica esperada, resultante do produto das frequências isoladas dos alelos que constituem o haplótipo, segundo VOGEL e MOTULSKY, 2000.(30)

Ex: a frequência de HLA-A* 02= 30% e HLA-B* 40= 11%, logo a frequência haplotípica do produto seria $30 \times 11 = 3,3\%$, porém este haplótipo é encontrado na frequência de 9% na população.

O desequilíbrio de ligação é influenciado pelos seguintes fatores:

- Inversões: pode aumentar o efeito do desequilíbrio de ligação, devido a diminuição do potencial de recombinação. (31)
- Deriva genética: sua influência é evidenciada em populações de menor tamanho, podendo resultar em determinados haplótipos, aumentando o desequilíbrio de ligação. (29)
- Taxas de recombinação: depende da distância genômica entre os segmentos analisados, podendo ser altas onde o desequilíbrio é menor; ou baixas taxas de recombinação onde o desequilíbrio é maior. (30;32)
- Seleção natural: algumas combinações de alelos são conservadas e transmitidas, quando podem resultar em benefícios para o portador. Assim há uma preservação de certos alelos, aumentando o desequilíbrio de ligação em certas regiões. (29)

- Crescimento populacional: um rápido crescimento populacional diminui o desequilíbrio de ligação, resultado do efeito adverso da deriva genética. (29)
- Conversão gênica: diminui o desequilíbrio de ligação, resultado da recombinação de dois eventos muito próximos. (29)

Incompatibilidades no Sistema HLA

Os avanços nas técnicas de tipagens dos antígenos leucocitários humanos, bem como a tipagem de alta resolução, reduz o risco de complicações imunológicas, rejeição do enxerto e do DECH. Incompatibilidades HLA podem provocar uma resposta imunológica pela apresentação de peptígenos estranhos ou por reconhecimento de fragmentos polimórficos. Incompatibilidades HLA são associadas a falha do enxerto, ao DECH, a reconstituição imunológica tardia, sobrevida livre da doença, recaída e a mortalidade. (33;34)

Como muitos pacientes não possuem doador HLA compatível, estudos recentes visam identificar as incompatibilidades permissivas. Os locus mais influentes no resultados dos transplantes são o HLA-A, -B, -C e DRB1. Estudos do Programa de Doadores do Japão (JMDP) avaliaram o efeito da combinação dos alelos HLA-A e -B de classe I que corresponderam a uma melhor sobrevida. (35) Uma análise do Programa de doadores de medula óssea dos EUA (NMDP) em 2004 relataram a importância da compatibilidade HLA-A, (nível alélico), -B e -DRB1 (incompatibilidade sorológica) são fatores de risco importantes para DECH aguda grave. A incompatibilidade em HLA-DRB1 aumenta a incidência de mortalidade em relação a incompatibilidades HLA de classe I. (36)

Incompatibilidades permissivas e não permissivas

Devido a evolução e reconhecimento de novos alelos, estudos têm avaliado a influência, impacto e a expressão das moléculas. As incompatibilidades no locus HLA-DPB1* são caracterizadas de acordo com os resultados clínicos em antígenos permissíveis e não permissíveis ao transplante. Fleischhauer et al, 2006 desenvolveram um algoritmo “epítipo de base funcional” em que se classificam as

incompatibilidades em permissivas e não permissivas baseado na imunogenicidade de uma célula de epitopo partilhada. (37; 38)

Estudos clínicos com grupos diferentes de pacientes demonstram aumento no risco da mortalidade em grupos de pacientes com antígenos não permissíveis em relação ao grupo receptores de antígenos permissíveis. Porém também concluíram que a alogenicidade nos dois grupos obterão resultados semelhantes, assim a resposta clínica destes pacientes pode ter resultados diferentes relativo a alorreatividade.(39)

Rutten, et al, demonstraram in vivo respostas imunológicas no pós transplante com doadores com incompatibilidades HLA-DPB1* permissivas e não permissivas. Posteriormente, para estudarem a imunogenicidade das moléculas HLA-DPB1*, na capacidade de gerar respostas alorreativas a HLA-DP em “respondedores” (células T CD4+ purificadas) desenvolveram um modelo in vitro, com HLA-DPB1* transferidas HeLa II, dos 4 alelos mais comuns da Europa. Os resultados obtidos mostraram que a presença de qualquer incompatibilidade HLA-DPB1* gerou alta frequência de respostas imunes. (34)

Algoritmo

Devido ao advento da tipagem por biologia molecular e estudos de alorreconhecimento, foi demonstrado que o polipeptídeo HLA-DPB1* pode induzir uma alorreatividade após o transplante de células tronco hematopoiética, levando a DECH aguda. Padrões de reatividade de células T sugeriram a expressão de um subconjunto de alelos HLA-DPB1* imunogênicos. Esses epítomos foram reconhecidos por todos os clones de células T alorreativas estudadas. O padrão de preditivo de imunogenicidade foi caracterizado de acordo com a tabela 3. (38)

Tabela 3- Classificação dos alelos HLA-DPB1* conforme sua predição de imunogenicidade. Com base no padrão de reconhecimento de células T descrito neste estudo, os grupos foram divididos em: imunogênico (grupo 1), intermediário (grupo 2) ou pouco imunogênico(grupo3).

Grupos	HLA-DPB1*	Frequências
		Caucasóides\Asiáticos\Africanos
1	0901, 1001, 1701	0.0180\0250\325
2	0301, 1401, 4501	0.1430\0750\060
3	0101, 0201, 0202, 0401, 0402, 0501, 0601, 1101, 1301, 1501, 1601, 1901, 2001, 2301, 4601	0.8390\8500\575

(Fonte: Adaptada de ZINO, et al, 2004).

Um algoritmo para permissividade dos alelos HLA-DPB1* em transplantes de células tronco-hematopoiéticas foi estabelecido, a partir da combinação de doador e receptor, este algoritmo permite prever a alorreatividade HLA-DPB1* específica, tabela 4. (38)

Tabela 4- Classificação das incompatibilidades HLA-DPB1* como permissivas ou não permissivas na DECH é indicada para todas as possíveis combinações. Um algoritmo para a permissividade das incompatibilidades do HLA-DPB1* de par doador receptor TMO. Os alelos HLA-DPB1* divididos em 3 grupos (1-3) de acordo com a sua imunogenicidade predita (Tabela 3). Os três grupos de alelos podem estar presentes em seis combinações diferentes em células diplóides. Os números indicam o grupo do primeiro (antes do corte) e o segundo (após o corte), o alelo HLA-DPB1* do doador ou do receptor.

		RECEPTOR					
		1/1	1/2	1/3	2/2	2/3	3/3
D O A D O R	1/1	PERMISSIVO			NÃO PERMISSIVO FALHA ENXERTIA		
	1/2						
	1/3						
	2/2	NÃO PERMISSIVO DECH			PERMISSIVO		
	2/3						
	3/3						PERMISSIVO

(Fonte: Adaptada de ZINO, et al, 2004(38))

Utilizando desta ferramenta de algoritmo modificada a análise de 621 transplantes em pacientes com doenças onco-hematológicas observaram uma sobrevida em 2 anos significativamente maior em transplantes com antígenos permissíveis em relação aos não-permissíveis (54,8% vs 39,1%, P = 0,005). (40)

A definição das incompatibilidades permissivas ou não tem implicações práticas e importantes. Baseado em padrões de alorreatividade de células T, o algoritmo foi descrito para avaliar as incompatibilidades não permissivas do HLA-DPB1*, mostrando significativa associação da mortalidade relacionada ao transplante. Alterando este algoritmo integrando dados funcionais, a análise retrospectiva de 621 TCTH não relacionados do Registro Italiano, forneceram evidências convincentes de que a evolução clínica pela seleção dos antígenos permissíveis pode trazer informações importantes na escolha do doador. (33)

Este algoritmo foi aplicado a estudos retrospectivos do Grupo de Trabalho Internacional de Histocompatibilidade em transplantes de células tronco hematopoéticas que analisaram 8.539 transplantes. Avaliando a compatibilidade 10/10 incompatibilidades não permissivas foram associadas a um risco maior de mortalidade global ($p=0,002$), recaída/mortalidade ($p<0,0001$), mas não em relação à recaída ($p=0,10$) em comparação as incompatibilidades permissivas.

Na compatibilidade 9/10, os resultados do grupo com incompatibilidades HLA-DPB1* não permissivas também apresentou um risco maior de mortalidade ($p=0,007$) e DECH aguda grave ($p=0,002$) em relação ao outro grupo. A frequência das incompatibilidades pode ser visualizada no gráfico 1. (41)

Gráfico 1- Resultados da compatibilidade do loco HLA-DPB1 na análise retrospectiva de 8.539 transplantes apresentados ao Grupo de Trabalho Internacional de Histocompatibilidade. (Fonte: FLEISCHHAUER, et al, 2012)

A utilização do algoritmo na classificação das incompatibilidades HLA-DPB1*, baseadas em grupos de células T de epítomos tem como objetivo estimar o impacto das incompatibilidades neste locus. As incompatibilidades permissivas podem ser toleradas, enquanto as incompatibilidades não permissivas aumentam os riscos após o transplante. Essa verificação pode ser avaliada através de uma ferramenta que permite que seja inserido a tipagem do receptor e de seu doador, e ver os epítomos previstos e decorrentes de previsão ao selecionar o doador apropriado. A implementação do algoritmo Epitope DPB1* T-Cell foi escrito em colaboração com Katharina Fleischhauer, San Raffaele Scientific Institute, Itália e Bronwen Shaw, Anthony Nolan Research Institute, no Reino Unido e pode ser acessado em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html>. (Acesso em: 15/09/2013)

Estudos clínicos têm indicado que o loci HLA-DPB1* funciona como os outros antígenos clássicos no processo de transplantação, em transplantes alogenéticos de células-tronco hematopoiéticos. Incompatibilidades no loci –DPB1* pode estar associado à doença do enxerto contra o hospedeiro, mas também pode estar associado ao risco de recaída da doença. (34)

Locus HLA-DP

O locus HLA-DP abrange 11.275 bps, possui 10 transcritos contendo um total de 28 exons. Disponível em: www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular?term=HLA-DP&classification. Acesso em: 07/04/2013.

O gene HLA-DP pertence ao HLA de classe II, é constituído por uma cadeia alfa (DPA) e uma cadeia beta (DPB), ambas ancoradas na membrana. A cadeia beta tem aproximadamente 26-28 kDa e seu gene possui 6 exons que codificam um peptídeo líder, exon 2 e 3 codifica os domínios extracelulares, o exon 4 codifica o domínio transmembrana e o exon 5 codifica a cauda citoplasmática. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=pubmed_gene&from_uid=22340965. Acesso em: 07/04/13.

Estudos evidenciam a cada dia novos aspectos relacionados aos antígenos HLA em relação à proteção ou suscetibilidade a doenças. Os polimorfismos conhecidos localizam-se no exon 2, região do gene de classe II que determina a fenda de ligação dos antígenos, assim devido a esta ser a região de ligação do antígeno, esses genes tem importante e relevante associação com doenças. O UKCCS que estuda as possíveis causas de cancer na infância, segundo Taylor et al, registrou em 2002, aumento significativode LLA na infância relacionado a presença do alelo DPB1*02:01. (42)

Incompatibilidades em HLA-DP não excluem um potencial doador, porém estas incompatibilidades tem demosntrado efeito significativo na incidência da DECH aguda. Estudos recentes demonstraram a presença de HLA-DPB1*05:01 em biópsias de pacientes pós-transplantados de células trocos-hematopoiéticas, com incompatibilidades –DP acometidos pela DECH aguda. (43)

As incompatibilidades em HLA-DP não são os únicos fatores que influenciam o acometimento da DECH, 20-50% dos receptores de doadores irmãos apresentam DECH. (43)

OBJETIVOS

Geral

O objetivo do presente estudo refere-se à análise das incompatibilidades no sistema HLA, Locus HLA-DPB1* resulta em algum impacto positivo ou negativo em pacientes que foram submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas com doadores relacionados. Assim os doadores são parentes consanguíneos de primeiro grau, irmãos, filhos do mesmo pai e da mesma mãe.

Específicos

- 1- Analisar o impacto das incompatibilidades do sistema HLA no locus HLA-DPB1* em pacientes pós-transplantados com células tronco-hematopoiéticas, com doadores consanguíneos.
- 2- Analisar a ocorrência e gravidade da Doença do Enxerto versus Hospedeiro nestes pacientes.
- 3- Analisar a frequência dos alelos HLA-DPB1* na população estudada.
- 4- Analisar se a permissividade das incompatibilidades condizem com os resultados da literatura.

CASUÍSTICA e METODOLOGIA

Casuística

No presente estudo, foram analisadas 826 amostras de receptores e seus doadores consanguíneos irmãos, resultando em 413 pares. Os transplantes foram realizados nas unidades de Transplante de Medula Óssea (TMO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e da Universidade Federal de Curitiba-UFPR, entre os anos de 1991 a 2011. Sendo este um estudo retrospectivo, os dados clínicos foram retirados dos prontuários dos pacientes e a caracterização dos parâmetros foi realizada pelos médicos dos pacientes.

Foram incluídos apenas amostras de receptores e seus doadores consanguíneos de primeiro grau, irmãos por ambos os genitores, com compatibilidades idênticas para os loci HLA-A*, HLA-B* em baixa/média resolução, HLA-DRB1* e HLA-DQB1* em alta resolução. Foi considerado na avaliação dos dados clínicos, período de até 2 anos no pós-transplante.

A obtenção da amostra de DNA genômica para a tipificação do sistema HLA foi realizada previamente ao transplante, durante a análise de compatibilidade para a realização do mesmo, em suas respectivas instituições. Bem como as tipificações dos loci comprovadamente relevantes já mencionados.

A caracterização quanto ao sexo dos doadores está descrito na figura 8:

Figura 8- Caracterização quanto ao sexo dos doadores. Do total de doadores, 232 eram do sexo masculino e 181 do sexo feminino; no grupo com 64 incompatibilidades doadores do sexo masculino foram 39 para 25 doadores do sexo feminino; e no grupo que considerou as incompatibilidades não permissivas foram 12 doadores do sexo masculino e 11 do sexo feminino (Fonte: Figura elaborada pelo autor).

As doenças de base que resultaram na necessidade do procedimento terapêutico do transplante, estão demonstradas no gráfico 2:

Gráfico 2- Descrição das doenças de base dos receptores do estudo. (fonte: gráfico elaborado pela autora)

Os parâmetros avaliados, de acordo com a caracterização dos dados clínicos dos centros de transplantes, foram a enxertia do enxerto caracterizada como Parcial ou Completa; ocorrência de rejeição em sim ou não; acometimento da DECH aguda em sim ou não; caracterização do Grau da DECH aguda em I, II, III e IV; acometimento

da DECH crônica em sim ou não; caracterização do grau da DECH crônica em limitada ou extenso; severidade da DECH crônica em leve, moderado ou severo; Evolução óbito a menos de 1 ano pós transplante. Os resultados absolutos dos receptores podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5- Resultados observados nos receptores

	Sim	Não	*NI
Enxertia	*C=342	*P =29	42
Óbito	137	269	38
Rejeição	95	246	72
DECHa	73	284	56
DECHc	96	254	63

*C=completa; *P=parcial; *NI=não informado (Fonte: tabela elaborada pela autora).

O perfil dos receptores quanto a quantidade de casos de acometimento da DECHa pode ser visualizado no gráfico 3, onde NI é a quantidade de casos não informado para este parâmetro. Pode também ser verificado a quantidade e o perfil dos receptores quanto a severidade da DECHc no gráfico 4.

Gráfico 3- Perfil dos receptores quanto ao grau da DECHa. (Fonte: elaborado pela autora)

Gráfico 4- Perfil dos receptores quanto a severidade da DECHc.

A quantidade de casos de DECHc limitada foi de: limitado 38 casos, extenso 48 casos, sem DECH 2 e 325 casos sem informação de DECHc.

Tipificações HLA

Para a realização da tipificação HLA do locus HLA-DPB1*, utilizamos as amostras de DNA extraídas e armazenadas nas respectivas instituições. Utilizou-se o kit comercial LABType®SSO Classe II DPA1/DPB1 da marca One Lambda referência RSSO2P lotes 3 e 4.

O objetivo da metodologia é a identificação dos alelos/grupos alélicos dos locos HLA-DPB1* através de hibridização de amostra de DNA com um conjunto de sondas de sequência de oligonucleotídeos específicas. A metodologia denominada SSOP- Sondas de Sequencia Específicas de nucleotídeos utiliza de sondas selecionadas em função de sua complementaridade às regiões polimórficas dos alelos dos genes HLA. Amostra de DNA foram amplificadas para os exons 2 e 3 do Locus HLA-DPB1* e para o o exon 2 do locus HLA-DPA1*, com primers específicos.

Amplificação

- Descongelar as amostras de DNA a serem amplificadas.
- Depois de descongeladas, agitar em vortex e dar um spin na centrífuga.
- Pipetar 1,5 ul de DNA no respectivo poço da placa PCR de acordo com a planilha de trabalho.
- Preparar a quantidade adequada de DMIX segundo a tabela 6 abaixo:

Tabela 6- Especificações das quantidades necessárias da amostra e dos reagentes.

Reagentes	1 DNA	8 DNAs	16 DNAs	32 DNAs	96 DNAs
D-mix	6,9	55,2	110,4	220,8	662,4
Primer	2	16	32	64	192
Taq polimerase	0,1	0,8	1,6	3,2	9,6
Amp mix (Dmix-primer-taq)	8,49				
DNA	1,5				

- Colocar a placa PCR em gelo e distribuir 8,49uL de solução de amplificação nos poços da placa de PCR.
- Após o término do procedimento, dar um spin na centrífuga e colocar no termociclador conforme a programação descrita na tabela 7:

Tabela 7- Programação dos ciclos de trabalho do termociclador.

Número de ciclos	Temperatura (C°)	Tempo
1 hold	96	3 min
5 ciclos	96	20 seg
	60	20 seg
	72	20 seg
	96	10 seg
30 ciclos	60	15 seg
	72	20 seg
1 hold	72	10 min
1 hold	4	infinito

- Após a reação de PCR ter sido concluída, retirar a placa do termociclador, envolver com papel filme e acondicionar a -20°C até a etapa posterior.

CORRIDA ELETROFORÉTICA

- Retirar a placa de PCR do freezer e aguardar descongelar.
- Colocar a placa em estante apropriada.
- Preparar o sistema de eletroforese

- Colocar um gel de agarose a 2,5%, previamente preparado com brometo de etídeo.
- Cobrir o gel com tampão TBE 1X.
- Aplicar 2 ul do produto amplificado no gel de agarose 2,5%, homogeneizando as amostras antes de cada aplicação.
- Cobrir a cuba com a tampa do sistema de eletroforese, onde estão localizados os eletrodos para contato.
- Iniciar a corrida de eletroforese, as amostras são submetidas a uma corrente elétrica de 150volts, 80mA por 10 minutos.
- Depois de finalizada a corrida, retirar a tampa da cuba e descartar o tampão em local apropriado.
- Retire o gel da cuba e visualizá-lo no transluminador. Analisar e fotografar o gel.
- Anotar o número das fotos na planilha de PCR/CITOMETRO.

OBS: esta etapa é extremamente importante para certificar a eficiência da amplificação.

HIBRIDIZAÇÃO

- Retirar a placa de PCR do congelador e aguardar descongelar em temperatura ambiente.
- Após descongelar transferir 2,5ul do DNA amplificado para uma nova placa PCR, devidamente identificada.
- Adicionar 1,25ul tampão de desnaturação, agitar em vortex, e incubar em temperatura ambiente por 10min. As amostras adquirem a cor roxa.
- Depois do período de incubação, adicionar 2,5ul tampão neutralização, agitar em vortex. As amostras adquirem a cor amarelo claro.
- Colocar a placa em banho de gelo para aguardar próxima etapa.
- Agitar as beads em vortex , durante 2 minutos.
- Preparar a solução das Beads em microtubo de 1,5mL, segundo a tabela 8 (ul).

Tabela 8- Preparo dos reagentes necessários para a hibridização.

Hibridização	1	8	16	24	32	96
Beads	2	16	32	48	64	192
Tampão de Hibridização	17	136	272	408	544	1632
Mistura em cada poço	17,8	17,8	17,8	17,8	17,8	17,8

- Agitar em vortex as beads em solução.
- Manter a placa em gelo e adicionar 17,8ul de mistura de beads em cada poço, agitar a placa em vortex por 20 seg.
- Incubar a placa por 15 min a 60°C em termociclador.
- Após a incubação adicionar rapidamente 40ul tampão de lavagem.
- Centrifugar por 5min a 1000 - 1300g.
- Flicar.
- Agitar a placa de PCR em vortex.
- Adicionar 40ul de tampão de lavagem, centrifugar por 5min a 1000 - 1300g, flicar e agitar a placa de PCR em vortex (repetir esta etapa por 2X).
- Durante a terceira lavagem, preparar a solução de SAPE 1X, de acordo com a tabela 9.

Tabela 9- Preparo da SAPE.

N. testes	SAPE	Tampão SAPE
1	0,25	24,75
8	2	198
16	4	396
24	6	594
32	8	792
96	24	2376

- Agitar em vortex a solução de SAPE por 20 segundos.
- Acondicionar a solução SAPE 1X no escuro até o momento da pipetagem
- Após a flicagem da terceira centrifugação, pipetar 23,7ul da solução de SAPE 1X em cada poço, agitar em vortex por 20 segundos
- Incubar a placa por 5 min a 60°C em termociclador
- Após a incubação adicionar rapidamente 40ul tampão de lavagem.
- Centrifugar por 5min a 1000 - 1300g.
- Flicar e agitar a placa de PCR em vortex.

- Adicionar 65ul de tampão de lavagem na placa de PCR.

Transferência das amostras para a placa de ELISA

- Agitar gentilmente as amostras com auxílio de pipeta multicanal.
- Transferir cada coluna de amostra da placa de PCR para placa ELISA fundo V, obedecendo a ordem numérica das colunas.
- Colocar a placa no analisador de fluxo **Luminex®**

Este método de hibridização reversa emprega, na primeira fase, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar os exons 2 e 3, que sintetizam a cadeias $\beta 2$ e $\beta 3$ do gene HLA-DDPB1*, utilizando *primers* genéricos marcados com biotina. Na segunda fase, o DNA amplificado é desnaturado e submetido à hibridização com um conjunto de sondas de sequência específica de oligonucleotídeos (SSOP) que estão imobilizadas em microesferas codificadas por coloração fluorescente. As microesferas de uma determinada tonalidade estão conjugadas a um único tipo de sonda. Após a hibridização, as microesferas são submetidas a um processo de lavagem e posterior reação com um conjugado de estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE), que se liga ao DNA amplificado biotinilado. Na última fase, um analisador de fluxo (LABScan 100) identifica a intensidade da fluorescência da ficoeritrina em cada microesfera. A designação dos alelos ou grupos alélicos é feita pelo software HLA Fusion que se baseia no padrão de reações positivas, reveladas pela intensidade de fluorescência da ficoeritrina, de cada amostra de DNA com o conjunto de sondas utilizadas. Os resultados são descritos em alta resolução.

Na tabela 10 estão designados os alelos testados de acordo com a bead a que estão impregnados.

Tabela 10- BEADS testadas e seus respectivos grupos e alelos específicos.

BEAD	ALELOS TESTADOS
081	DPB1*11:01:01~01:02; DPB1*15:01; DPB1*31:01; DPB1*34:01; DPB1*52:01; DPB1*56:01; DPB1*67:01; DPB1*72:01; DPB1*74:01; DPB1*87:01; DPB1*95:01; DPB1*102:01
082	DPA1*01:10 39
083	DPB1*46:01; DPB1*50:01; DPB1*57:01; DPB1*80:01; DPB1*108:01
084	DPB1*08:01; DPB1*10:01; DPB1*16:01; DPB1*25:01; DPB1*37:01; DPB1*45:01; DPB1*68:01; DPB1*79:01; DPB1*93:01; DPB1*122:01; DPB1*136:01New: DPB1*136:01
085	DPB1*06:01; DPB1*08:01; DPB1*09:01; DPB1*10:01; DPB1*13:01; DPB1*16:01; DPB1*17:01; DPB1*19:01; DPB1*21:01; DPB1*22:01; DPB1*29:01; DPB1*30:01; DPB1*37:01; DPB1*44:01; DPB1*54:01; DPB1*55:01; DPB1*58:01; DPB1*64:01N; DPB1*88:01; DPB1*93:01; DPB1*103:01; DPB1*106:01; DPB1*107:01; DPB1*110:01; DPB1*131:01; DPB1*133:01 New: DPB1*133:01
086	DPB1*25:01; DPB1*28:01; DPB1*45:01; DPB1*59:01; DPB1*73:01; DPB1*136:01 DPB1*136:01
087	DPB1*09:01; DPB1*17:01; DPB1*35:01:01~01:02; DPB1*46:01; DPB1*80:01; DPB1*86:01; DPB1*88:01; DPB1*98:01; DPB1*131:01; DPB1*132:01
088	DPB1*70:01 7
089	DPB1*02:01:02~02; DPB1*06:01; DPB1*16:01; DPB1*17:01; DPB1*21:01; DPB1*22:01; DPB1*30:01; DPB1*32:01; DPB1*33:01; DPB1*41:01:01; DPB1*46:01; DPB1*47:01; DPB1*48:01; DPB1*55:01; DPB1*58:01; DPB1*64:01N; DPB1*71:01; DPB1*81:01; DPB1*86:01; DPB1*93:01; DPB1*95:01; DPB1*101:01; DPB1*103:01; DPB1*109:01; DPB1*113:01; DPB1*115:01; DPB1*117:01; DPB1*123:01; DPB1*131:01
090	DPB1*10:01; DPB1*45:01; DPB1*113:01; DPB1*129:01
091	DPB1*118:01
092	DPB1*06:01; DPB1*11:01:01~01:02; DPB1*15:01; DPB1*20:01:01~01:02; DPB1*28:01; DPB1*31:01; DPB1*34:01; DPB1*59:01; DPB1*64:01N; DPB1*69:01; DPB1*72:01; DPB1*74:01; DPB1*87:01; DPB1*91:01; DPB1*95:01; DPB1*102:01; DPB1*108:01; DPB1*130:01; DPB1*136:01 DPB1*136:01 DPB1*01:01:01~01:03; DPB1*02:01:02~02; DPB1*03:01:01~01:02; DPB1*04:01:01~02:01:02; DPB1*05:01:01~01:02; DPB1*06:01; DPB1*08:01; DPB1*09:01; DPB1*10:01; DPB1*11:01:01~01:02; DPB1*13:01; DPB1*14:01; DPB1*15:01; DPB1*16:01; DPB1*17:01; DPB1*18:01; DPB1*19:01; DPB1*20:01:01~01:02; DPB1*21:01; DPB1*22:01; DPB1*23:01; DPB1*24:01; DPB1*25:01; DPB1*26:01:01~01:02; DPB1*27:01; DPB1*28:01; DPB1*29:01; DPB1*30:01; DPB1*31:01; DPB1*32:01; DPB1*33:01; DPB1*34:01; DPB1*35:01:01~01:02; DPB1*36:01; DPB1*37:01; DPB1*39:01; DPB1*40:01; DPB1*41:01:01~01:02; DPB1*44:01; DPB1*45:01; DPB1*46:01; DPB1*47:01; DPB1*48:01; DPB1*49:01; DPB1*50:01; DPB1*51:01; DPB1*52:01; DPB1*53:01; DPB1*54:01; DPB1*55:01; DPB1*56:01; DPB1*57:01; DPB1*58:01; DPB1*59:01; DPB1*60:01; DPB1*61:01N; DPB1*62:01; DPB1*63:01; DPB1*64:01N; DPB1*65:01; DPB1*04:01:01=DPB1*04:01:01:01, DPB1*04:02=DPB1*04:02:01:01
093	DPB1*66:01; DPB1*67:01; DPB1*68:01; DPB1*69:01; DPB1*70:01; DPB1*71:01; DPB1*72:01; DPB1*73:01; DPB1*74:01; DPB1*75:01; DPB1*76:01; DPB1*77:01; DPB1*78:01; DPB1*79:01; DPB1*80:01; DPB1*81:01; DPB1*82:01; DPB1*83:01; DPB1*84:01; DPB1*85:01; DPB1*86:01; DPB1*87:01; DPB1*88:01; DPB1*89:01; DPB1*90:01; DPB1*91:01; DPB1*92:01; DPB1*93:01; DPB1*94:01; DPB1*95:01; DPB1*96:01; DPB1*97:01; DPB1*98:01; DPB1*99:01; DPB1*100:01; DPB1*04:01:01:02, DPB1*04:01:03, DPB1*04:02:01:02, DPB1*133:01, DPB1*134:01, DPB1*136:01 DPB1*101:01; DPB1*102:01; DPB1*103:01; DPB1*104:01; DPB1*105:01; DPB1*106:01; DPB1*107:01; DPB1*108:01; DPB1*109:01; DPB1*110:01; DPB1*111:01; DPB1*112:01; DPB1*113:01; DPB1*114:01; DPB1*116:01; DPB1*117:01; DPB1*118:01; DPB1*119:01; DPB1*120:01N; DPB1*121:01; DPB1*122:01; DPB1*124:01; DPB1*125:01; DPB1*126:01; DPB1*127:01; DPB1*128:01; DPB1*129:01; DPB1*130:01; DPB1*131:01; DPB1*132:01; DPB1*133:01; DPB1*134:01; DPB1*136:01
094	DPB1*123:01
095	DPB1*05:01:01~01:02; DPB1*24:01; DPB1*36:01; DPB1*38:01; DPB1*97:01; DPB1*100:01; DPB1*114:01
096	DPB1*113:01; DPB1*129:01
098	DPB1*128:01
099	DPB1*127:01
100	DPA1*01:06:01~06:02

(Fonte: Tabela elaborada pela autora.)

Análises Estatísticas

A análise estatística utilizou-se do teste exato de Fisher, cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% (IC 95%), através do software GraphPadInStat 3.06 (GraphPad Software 2003), entre os resultados obtidos nos dois grupos, ou seja, o grupo com incompatibilidade para o locus HLA-DPB1* e o grupo com compatibilidade. Também foi utilizado o mesmo critério para analisar o grupo incompatível (grupo 1) e o grupo com incompatibilidade permissível (grupo 2) segundo o site: www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html.

Os critérios analisados foram a enxertia do enxerto, rejeição/ recaída, o grau da DECH aguda, grau da DECH crônica e evolução/óbito.

RESULTADOS

As análises levaram em consideração os grupos compatíveis e incompatíveis, o grupo com incompatibilidades foi subdividido em dois grupos para melhor exposição, grupo 1 e grupo 2. Primeiro consideramos somente as incompatibilidades não permissivas como grupo 1, resultando em 23 incompatibilidades. O grupo 2 considerou todas as incompatibilidades, permissivas e não permissivas resultantes no total de 64 incompatibilidades. Sendo assim, foram realizadas duas análises dos grupos incompatíveis para verificarmos também as permissividades. Os dados clínicos dos receptores foram obtidos dos prontuários dos centros de TMO.

Foram realizadas as análises em dois grupos distintos, no primeiro grupo, denominado grupo 1 considerou-se apenas as incompatibilidades reconhecidamente não permissivas. Enquanto que no grupo 2 considerou-se também as incompatibilidades permissivas de acordo com o algoritmo do site <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html>

Apenas 55,20% dos resultados das tipificações HLA-DPB1* foram obtidos em dois dígitos, o restante foram ambiguidades. Para analisarmos as ambiguidades, refinamos as tipificações em Grupos P, assim as diferenças nas sequências de nucleotídeos estarão localizadas fora da região codificante da fenda de ligação, o que não impacta no reconhecimento do antígeno.

A porcentagem de incompatibilidades encontradas no presente estudo está descrita no gráfico 5, sendo que 84% dos pares foram compatíveis.

Gráfico 5- Porcentagem das compatibilidades e incompatibilidades encontradas (Fonte: figura elaborada pela autora).

Os resultados obtidos pelas análises estatísticas no grupo 1 estão relacionados na tabela 11.

Grupo 1:

Tabela 11- Resultados analisados do grupo 1.

	p	OR	IC 95%
Enxertia	p=0,628	3,074	0,180-52,497
Rejeição	p=0,788	0,788	0,250-2,480
DECHa	p=0,775	0,728	0,206-2,571
Grau DECHa	p=0,020	6,833	1,685-27,711
Grau do DECHc	p=0,583	1,407	0,512-3,866
Severidade DECHc	p=0,398	2,706	0,468-15,645
Evolução	p=0,494	0,636	0,243-1,665

(Fonte: Figura elaborada pelo autor.)

Assim como os resultados obtidos no grupo 2, estão relacionados na tabela 12.

Grupo 2:

Tabela 12- resultados analisados do grupo 2.

	p	OR	IC 95%
Enxertia	p=1,000	1,052	0,350-3,158

Rejeição	p=0,609	0,791	0,394-1,589
DECHa	p=0,358	0,654	0,294-1,456
Grau DECHa	p=0,020	4,42	1,348-14,495
Grau do DECHc	p=0,863	1,073	0,550-2,095
Severidade DECHc	p=0,398	2,706	0,468-15,645
Evolução	p=0,655	0,848	0,243-1,665

(Fonte: Figura elaborada pelo autor.)

O grau da DECH aguda encontrada foi 17 casos para o grau I, 23 casos para o Grau II, 21 casos para o grau III e 12 casos para o grau IV, em um total de 73 ocorrências. Sendo que, nos grupos incompatíveis encontrou-se 8 incompatibilidades no grupo 2 e 3 incompatibilidades no grupo 1, conforme tabela 13.

Tabela 13- Descrição dos graus da DECHa encontrados nos grupos incompatíveis.

Grau do DECHa	Grupo 1	Grupo 2
I	0	1
II	1	2
III	0	0
IV	2	2

(Fonte: tabela elaborada pela autora.)

DISCUSSÃO

O transplante de células tronco-hematopoiéticas tem sido usado para o tratamento de várias doenças hematológicas e onco-hematológicas, hereditárias e imunológicas. O prêmio Nobel de medicina foi concedido ao Dr. Donnal Thomas em 1990, pelo trabalho experimental, clínico e pela criação do TMO em Seattle (EUA). (2) Considerado por muitos o pai do transplante de Medula Óssea, vindo a falecer em 2012.

Conforme já apresentado, a Doença do enxerto versus o hospedeiro é a maior complicação no pós-transplante de células tronco-hematopoiéticas, responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade. (4) Sendo sua incidência de 94% em doadores incompatíveis, e 70% em doadores não relacionados compatíveis para os locus HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 e incompatíveis para o locus HLA-DPB1*. Porém no presente estudo encontramos a incidência de 17,67% de DECHa e 22,51% de DECHc, totalizando um resultado de 40,18% de acometimento desta enfermidade, gráfico 6. Esta taxa reduzida em relação ao trabalho de IBISCH et al, atribuímos ao fato de utilizarmos doadores aparentados, e devido a impossibilidade da realização da tipificação de todos os locus do Sistema HLA.

Gráfico 6- O acometimento da DECH nos pacientes transplantados foi de 40,12%, sendo 22,51% de DECHc e 17,67 de DECHa. (Fonte: gráfico elaborada pela autora)

Assim a porcentagem de incompatibilidades encontradas de 40,12% abaixo da relatada na literatura de 70%, pode ter sido decorrente do número amostral, ou do fator ascendência, sendo que não há muitos estudos que relata a porcentagem de incompatibilidades.

Sendo que no tratamento da DECH aguda utiliza-se de profilaxia primária, terapia primária, terapia secundária (caso haja falha na primária), baseado na hipótese clínica a ausência de tratamento a doença progride para a forma crônica da doença. Assim o prognóstico da DECH aguda correlaciona-se bem com a resposta ao tratamento, os pacientes que respondem ao tratamento têm 22% de mortalidade em relação a 75% de pacientes que a DECH aguda progressiva ou que não respondem ao tratamento. (14)

Entretanto, a análise primordial deste estudo, resultou em uma significância estatística, no grau de acometimento da doença do enxerto versus hospedeiro aguda, observando-se mais casos de grau IV. Sendo o grau IV a forma mais grave da DECH aguda, sabendo-se que o grau da DECHa é preditivo da evolução dos pacientes, que pacientes sem resposta ou com progressão da doença apresenta taxas de mortalidade elevada de 75%, que a incidência de acometimento da DECHa é elevada em receptores com os fatores de risco já apresentados, e que há tratamentos com bons prognósticos para reverter a doença, o resultado do presente

estudo, visa salientar que pacientes com incompatibilidade no Locus HLA-DPB1* apresentam maiores chances de desenvolverem DECH aguda.

Devido ao fato da Tipificação HLA-DPB1* não ser um procedimento protocolar em nenhuma enfermidade, terapia ou prognóstico, reconhecido cientificamente ainda, há poucos relatos sobre sua frequência, inclusive no Brasil.

Porém está em discussão, no Sistema Nacional de Transplantes Brasileiro a implementação da solicitação da tipificação HLA-DPB1* a receptores de órgãos sólidos como os rins, quando forem detectados anticorpos anti HLA-DPB1* pré-formados no soro do receptor contra os antígenos HLA do doador, conforme conferência realizada no Congresso da Associação Brasileira de Transplantes ocorrida em outubro de 2013, pela apresentação do Dr. Eder Muralha Borba coordenador do SNT.

O que justifica o presente trabalho, visando à colaboração para o cenário do conhecimento do impacto do HLA-DPB1 na DECH, assim também como o conhecimento das frequências dos alelos deste locus. O site <http://www.allelefrequencies.net> é um banco de dados das frequências relatadas pelos pesquisadores de todo o mundo, assim podemos comparar as frequências encontradas no presente trabalho, com as frequências já relatadas brasileiras. Este site é uma ferramenta de auxílio para muitos pesquisadores, estudiosos e profissionais utilizando-o na elucidação das frequências, associação dos haplótipos e verificação dos alelos raros. Na tabela 14 estão apresentados os resultados encontrados neste estudo e, comparando-os com a frequência brasileira conforme o site <http://www.allelefrequencies.net>, acessado em 31-10-2013, pode verificar que muitos dos alelos encontrados no estudo, não são encontrados no site. Devido ao fato de não haver muitos estudos referente a este locus no Brasil, de não ser uma tipificação de rotina e de ser um locus de reconhecimento recente atribuímos a questão de não haver muitos relatos deste locus em nossa população.

Tabela 14- Representação dos alelos encontrados com suas respectivas quantidades e frequências, comparadas às frequências relatadas no site allele frequency.

Alelos HLA-DPB1*	Quantidade	Frequência Encontrada	Frequência Brasileira
01:01	121	8,37%	0%
02:01	237	16,40%	7,5%
03:01	50	3,46%	27,5%
04:01	352	24,35%	7,5%
04:02	143	9,89%	65%
05:01	80	5,53%	10%
06:01	21	1,45%	0%
09:01	12	0,83%	0%
10:01	36	2,49%	0%
11:01	33	2,28%	0%
14:01	53	3,66%	0%
17:01	42	2,90%	0%
18:01	14	0,96%	0%
20:01	3	0,20%	0%
23:01	13	0,89%	0%
33:01	13	0,89%	0%
39:01	1	0,06%	0%
40:01	6	0,41%	0%
70:01	2	0,13%	0%
90:01	1	0,06%	0%
98:01	6	0,41%	0%
100:01	2	0,13%	0%
104:01	40	2,76%	0%
105:01	63	4,35%	0%
107:01	9	0,62%	0%
125:01	1	0,06%	0%
126:01	21	1,45%	0%
131:01	2	0,13%	0%
134:01	63	4,35%	0%

(Fonte: Tabela elaborada pela autora.)

Continuando a comparação dos resultados deste trabalho com as frequências mundiais do locus HLA-DPB1* relatadas no site allele frequency, acessado em 31-10-2013, como podemos verificar a seguir na tabela 15.

Tabela 15- Frequência dos alelos HLA-DPB1* encontrados nos respectivos países relacionados.

Alelos HLA-DPB1*	Frequências	Países
01:01	8-9%	Grécia, República Checa
02:01	13-30%	Reino Unido, Nova Zelândia
03:01	8,8-25	Republica Checa
04:01	50-61%	Austrália, China, República Checa
04:02	8,5-13%	Índia, Reino Unido
05:01	3-6%	Áustria, República Checa, França, Itália
06:01	2-6%	França, Itália
09:01	1-6%	França, Grécia
10:01	3-4%	Áustria, República Checa, França, Itália, Reino Unido
11:01	2%	Áustria, República Checa, França
14:01	2-4,5%	França, Republica Checa
17:01	3-4,9%	França, Grécia, Republica Checa
18:01	0%	Sem relatos
20:01	0%	Sem relatos
23:01	0,8-1,5%	França, Áustria
33:01	0,4-0,5%	Grécia, Alemanha, Itália
39:01	2%	Itália
40:01	0%	Sem relatos
70:01	0%	Sem relatos
90:01	0%	Sem relatos
98:01	0%	Sem relatos
100:01	0%	Sem relatos
104:01	0%	Áustria
105:01	0%	Sem relatos
107:01	6,5-7,5%	Áustria, Sudão
125:01	0%	Sem relatos
126:01	0%	Sem relatos
131:01	0%	Sem relatos
134:01	0%	Sem relatos

(Fonte: Tabela elaborada pelo autor.)

Não há nenhum trabalho publicado, até então, relatando a frequência do locus HLA-DPB1* na população brasileira. Como podemos verificar, a frequência desta população assemelha-se a frequência de países como a Áustria, França República Checa e da Itália.

CONCLUSÃO

Atualmente podemos vivenciar a velocidade no desenvolvimento da ciência e da medicina. Com o advento das novas técnicas de biologia molecular o conhecimento de novos alelos cresce exponencialmente, resultando na necessidade da verificação do impacto e permissividade dos novos alelos. Assim, o presente estudo avaliou que as incompatibilidades permissivas e não permissivas representam maior risco do desenvolvimento da DECH aguda em pacientes submetidos a transplantes de células tronco-hematopoiéticas. Concluímos que o impacto das incompatibilidades se restringe ao acometimento do DECH agudo, não observando impacto em outros fatores críticos nos pós-transplantes como na enxertia do enxerto, na DECH crônica e na mortalidade.

Também apresentamos a frequência do locus HLA-DPB1* através da população estudada, demonstrando que os alelos HLA-DPB1*04:01 (24,35%), HLA-DPB1*02:01(16,40%), HLA-DPB1*04:02 (9,89%) e HLA-DPB1*01:01 (8,37%) apresentaram as maiores frequências e que há a representatividade de alelos até então não relatados na população brasileira.

Referências

Referências

- (1) ABBAS AK, LICHTMAN AH. O complexo principal de histocompatibilidade. Imunologia Celular e Molecular. 5.ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- (2) Garcia VD, Abbud Filho M, Neumann J. Transplantes de Órgãos e Tecidos. 2 ed. ed. São Paulo: Segmento Farma; 2006.
- (3) Bouzas LFS, Silva MM, Tavares RBS, Moreira MCR, Correa MEP, Funke VAM, et al. Diretrizes para o diagnóstico, classificação, profilaxia e tratamento da doença enxerto contra hospedeiro crônica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2010;22-39.
- (4) Lampert IA, Janossy G, Suijters AJ, Bofill M, Palmer S, Gordon-Smith E, et al. Immunological analysis of the skin in graft versus host disease. Clin Exp Immunol 1982 Oct;50(1):123-31.
- (5) Orti-Raduan ES. Doença do Enxerto contra hospedeiro crônica em mucosa bucal: relação entre as células de Langerhans com a expressão da quimiocina CCL20 e seu receptor CCR6 [Tese]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2011.
- (6) Schubert MM, Correa ME. Oral graft-versus-host disease. Dent Clin North Am 2008 Jan;52(1):79-ix.
- (7) Lee JW, Deeg HJ. Prevention of chronic GVHD. Best Pract Res Clin Haematol 2008 Jun;21(2):259-70.
- (8) Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A, Dahllof G, Ljungman P, Ringden O. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. Arch Oral Biol 1992;37(7):539-47.
- (9) Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa CA, Almeida OP, et al. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. J Oral Pathol Med 2005 Jul;34(6):368-73.
- (10) Hasseus B, Jontell M, Brune M, Johansson P, Dahlgren UI. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. Scand J Immunol 2001 Nov;54(5):516-24.
- (11) Sato M, Tokuda N, Fukumoto T, Mano T, Sato T, Ueyama Y. Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. J Oral Pathol Med 2006 Jan;35(1):33-6.
- (12) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-

- host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005 Dec;11(12):945-56.
- (13) Park M, Seo JJ. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Res* 2012;2012:680841.
 - (14) Azevedo W. Doença enxerto versus hospedeiro aguda A-GVHD. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2010;16-21.
 - (15) BALMAN FF, et al. Transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico e doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHA): uma revisão da profilaxia e tratamento. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 32. 2009.
Ref Type: Magazine Article
 - (16) Saliba RM, de Lima M, Andersson B, Kouri IF, Housing C, Ghosh S, et al. Hyperacute GVHD: risk factors, outcomes and clinical implications. *Blood* 2007;2751-2758.
 - (17) Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988 Jun;108(6):806-14.
 - (18) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990 Feb 1;75(3):555-62.
 - (19) Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999 Jul 1;94(1):333-9.
 - (20) Ibisch C, Gallot G, Vivien R, Diez E, Jotereau F, Garand R, et al. Recognition of leukemic blasts by HLA-DPB1-specific cytotoxic T cell clones: a perspective for adjuvant immunotherapy post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999 Jun;23(11):1153-9.
 - (21) Voltarelli J, Stracieri A. Aspectos imunológicos dos transplantes de células tronco hematopoiéticas. *Medicina* 2000;443-462.
 - (22) Marti L. Estudo do efeito imunomodulatório de células tronco mesenquimais. CDi/FAPESP - Centro de Documentação e Informação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo . 2013.
Ref Type: Abstract
 - (23) Ferreira AP, Teixeira HC. Complexo de histocompatibilidade principal. *Tópicos de Imunologia Básica*. 1 ed ed. Juiz de Fora: Central Formulários; 2005. p. 41-50.
 - (24) Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000 Sep 14;343(11):782-6.
 - (25) Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004 Dec;64(6):631-49.
 - (26) Campbell RD, Milner CM. MHC genes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1993 Dec;5(6):887-93.

- (27) Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopes R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA. Nucleic Acids Research 2013.
- (28) PEREIRA NF, et al. Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 32, 3-5. 2010.
Ref Type: Magazine Article
- (29) Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Nat Rev Genet 2002 Apr;3(4):299-309.
- (30) Vogel.F, Motulsky AG. Genética Humana:problemas e abordagens. 3 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- (31) Yu A, Zhao C, Fan Y, Jang W, Mungall AJ, Deloukas P, et al. Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. Nature 2001 Feb 15;409(6822):951-3.
- (32) Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de ODM, Visentainer JE, Tsuneto LT, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. Hum Biol 2000 Aug;72(4):597-617.
- (33) Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2009 Aug 13;114(7):1437-44.
- (34) Rutten CE, Van Luxemburg-Heijs SA, Van Der Meijden ED, Griffioen M, Oudshoorn M, Willemze R, et al. HLA-DPB1 mismatching results in the generation of a full repertoire of HLA-DPB1-specific CD4+ T cell responses showing immunogenicity of all HLA-DPB1 alleles. Biol Blood Marrow Transplant 2010 Sep;16(9):1282-92.
- (35) Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. Blood 2002 Jun 1;99(11):4200-6.
- (36) Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. Blood 2004 Oct 1;104(7):1923-30.
- (37) Fleischhauer K, Zino E, Mazzi B, Sironi E, Servida P, Zappone E, et al. Peripheral blood stem cell allograft rejection mediated by CD4(+) T lymphocytes recognizing a single mismatch at HLA-DP beta 1*0901. Blood 2001 Aug 15;98(4):1122-6.
- (38) Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficara F, Di TS, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. Blood 2004 Feb 15;103(4):1417-24.
- (39) Rutten CE, Van Luxemburg-Heijs SA, Van Der Meijden ED, Griffioen M, Oudshoorn M, Willemze R, et al. Both permissive and nonpermissive HLA-DPB1 mismatches can induce polyclonal HLA-DPB1 specific immune responses in vivo and in vitro. Blood 2010 Jan 7;115(1):151-3.

- (40) Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, Madrigal JA, Begovich AB, Horowitz MM, et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2007 Dec 15;110(13):4560-6.
- (41) Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2012 Apr;13(4):366-74.
- (42) Urayama KY, Chokkalingam AP, Metayer C, Ma X, Selvin S, Barcellos LF, et al. HLA-DP genetic variation, proxies for early life immune modulation and childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Blood* 2012 Oct 11;120(15):3039-47.
- (43) Gaschet J, Gallot G, Ibsch C, Lim A, Even J, Vivien R, et al. Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1*1001 mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone Marrow Transplant* 1998 Aug;22(4):385-92.

Anexo 1- Sinais e sintomas da DECHc

Órgão ou sistema	Diagnóstico (Suficiente para estabelecer o diagnóstico de DECH-c)	Distinto (visto na DECH-c, mas insuficiente para estabelecer sozinho o diagnóstico de DECH-c)	Outras características	Comuns (vistos tanto na DECH-a como crônica)
Pele	Poiquilodermia Líquen-plano <i>like</i> Alterações de Esclerose Mórfea- <i>like</i> Esclerose não móvel Líquen escleroso	Despigmentação	Alteração na sudorese Idiose Ceratose Pilar Hipopigmentação Hiperpigmentação	Eritema Lesões máculo-papulosas Prurido
Unhas		Distrofia Estrias longitudinais Unhas opacas, Onicólise Perda das unhas		
Cabelos		Alopecia cicatrizante ou não cicatrizante (após a quimioterapia) Descamação com pápulas no couro cabeludo	Couro cabeludo com cabelos escassos, ásperos Canice precoce	
Boca	<i>Like-plano like</i> Placas hiperkeratóticas Restrição na abertura da boca pela esclerose	Xerostomia Mucocela Mucocela Atrofia da mucosa Pseudomembranas Úlceras		Gengivite Mucosite Eritema Dor
Olhos		Sensação de areia nos olhos, ressecamento e dor Conjuntivite cicatricial Ceratoconjuntivite sicca Áreas confluentes de ceratopatia punctuada	Fotofobia Hiperpigmentação periorbitária Blefarite(eritema ao redor olhos com edema)	
Genitália	<i>Like-plano like</i> Sinéquia e estenose da vagina	Erosões Fissuras Úlceras		
Trato GI	Membranas no esôfago Estreitamento ou estenose do terço superior e médio do esôfago		Insuficiência do pâncreas exócrino	Anorexia Náusea; vômitos Diarreia Perda de peso; Déficit de crescimento (crianças)
Fígado				Bilirrubina total, fosfatase alcalina >2 x acima limite normal ALT e AST.> 2 X limite normal
Pulmão	Bronquiolite obliterante diagnosticada com biópsia pulmonar	Bronquiolite obliterante diagnosticada com TFPs e radiologia		
Músculos, fáscia e articulações	Fasciíte Articulações endurecidas ou contratura secundária a esclerose	Miosite ou polimiosite	Edema Câimbras musculares Artralgia ou artrite	
Hematopoético e Imune			Trombocitopenia Eosinofilia Linfopenia Hipo- ou Autoanticorpos (AHAI e PTI)	
Outros			Derrame pericárdico e pleural Ascite Neuropatia periférica Síndrome Miastenia gravis Cardíaco: anormalidade na condução ou cardiomiopatia	
Em todos os casos, infecção, efeitos de drogas, malignidade. ou outras causas devem ser excluídas. Diagnóstico da DECH-c requer confirmação por radiologia ou biópsia (ou teste Schirmer para os olhos). ALT- aminotransferase alanina; AST- aminotransferase aspartase; BOOP - bronquiolite obliterante organizada com pneumonia; TFPs- testes de função pulmonar; AIHA- anemia hemolítica autoimune; PTI-púrpura trombocitopênica idiopática				

(Fonte: BOUZAS, et al, 2010)