

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA DE DO
ADOLESCENTE

**FREQUÊNCIA DOS ANTIGENOS E ANTICORPOS
NEUTROFÍLICOS HUMANOS (HNA) EM DOADORES
E RECEPTORES DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO
DE CÉLULA TRONCO HEMATOPOIÉTICA (TCTH) E
SUA CORRELAÇÃO COM DOENÇA ENXERTO
CONTRA HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA**

DISSERTAÇÃO MESTRADO

FABIANA DE SOUZA PEREIRA

Porto Alegre, Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**FREQUÊNCIA DOS ANTIGENOS E ANTICORPOS
NEUTROFÍLICOS HUMANOS (HNA) EM DOADORES
E RECEPTORES DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO
DE CÉLULA TRONCO HEMATOPOIÉTICA (TCTH) E
SUA CORRELAÇÃO COM DOENÇA ENXERTO
CONTRA HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA**

FABIANA DE SOUZA PEREIRA

Orientador: Profa. Dra. Liane Esteves Daudt

A apresentação desta
dissertação é exigência do Programa
de Pós-Graduação em Saúde da
Criança e do Adolescente, da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO / TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

15/12/2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Dr. Gustavo Brandão Fischer

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Profª Dra. Têmis Maria Félix

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza Pereira, Fabiana
FREQUÊNCIA DOS ANTIGENOS NEUTROFÍLICOS HUMANOS
(HNA) EM DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE
ALOGÊNICO DE CÉLULA TRONCO HEMATOPOIÉTICA (TCTH) E SUA
CORRELAÇÃO COM DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO
(DECH) AGUDA / Fabiana de Souza Pereira. -- 2015.
77 f.

Orientador: Liane Esteves Daudt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Transplante de célula tronco hematopoiética.
2. Antígeno neutrofílico humano. I. Esteves Daudt, Liane, orient. II. Título.

EPÍGRAFE

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente à minha mãe, Vera, pelo grande incentivo, ao meu irmão, Fernando, por muitas vezes me mostrar o Norte e ao meu marido, Márcio e meu filho, Arthur pelo seu amor e carinho que são indispensáveis.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao corpo docente e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente;

A minha orientadora, Professora Dra Liane Esteves Daudt, pela paciência, atenção, disponibilidade, competência e comprometimento;

Ao Dr. Jorge Neumann, que permitiu que os experimentos fossem realizados no laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre;

À FIPE - HCPA pelo auxílio financeiro à pesquisa;

À Heloísa Tarasconi, pela grande colaboração na realização dos experimentos, pelo incentivo e pela amizade;

Aos colegas do laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre pela compreensão e apoio;

À Vania Naomi Hirakata, consultora do GPPG, pela análise estatística deste trabalho;

À Liselena Carvalho, enfermeira do 5º Sul, pela colaboração na coleta dos pacientes;

Aos médicos do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente à Dra. Alessandra Paz, pela colaboração na coleta das amostras dos doadores;

Aos pacientes, doadores e seus familiares que, apesar do breve contato, me ensinaram lições de coragem, resignação, amor, paciência e humildade;

E à minha mãe, irmãos, marido e filho que sempre me deram apoio, incentivo e carinho.

RESUMO

Background e objetivo. A reconstituição celular hematopoiética com o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênicas é um método de tratamento estabelecido para uma variedade de doenças hematológicas, oncológicas e imunológicas. Entretanto, TCTH está associado a considerável morbimortalidade devido a fatores como recidiva da doença de base, grau de compatibilidade HLA, tipo de regime de condicionamento e infecções durante o período de neutropenia. Este estudo investigou a associação entre o aloantígeno neutrofílico humano (HNA) e o dia de pega, a ocorrência de DECH aguda e TRM em pacientes que foram submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico.

Tipo de estudo e local. Estudo de coorte prospectivo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Métodos. Avaliamos 27 pacientes transplantados entre maio de 2013 e abril de 2014 e seus respectivos doadores. A tipagem HNA foi realizada, nas amostras dos doadores, por PCR-SSP e os anticorpos anti-HNA foram detectados nos pacientes utilizando o kit LABSCREEN MULTI (LSMUTR – One Lambda).

Resultados. A idade variou entre 1 a 63 anos, com uma média de $20,4 \pm 17,5$ anos. Dezenove pacientes eram pediátricos (<21 anos) com média de idade de $10,05 \pm 6,4$ anos e entre os pacientes adultos a média foi $42,2 \pm 12,6$ anos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino 16 (59,3%). As leucemias agudas foram frequentes em 19 (70,4%) dos pacientes, outras doenças oncohematológicas malignas (Linfoma Hodgkin e Linfoma não Hodgkin) estiveram em 3 (11,1%) e as não malignas (síndrome mielodisplásica, osteopetrose, hemoglobinúria paroxística noturna, aplasia e doença granulomatosa) estiveram em 6 (22,2%) dos casos. A maioria dos pacientes 19 (70,4%), apresentavam a doença há menos de 12 meses na época do transplante e 24 (88,9%) deles foram totalmente compatível com seus doadores

quanto ao sistema HLA. O regime de condicionamento mieloablativo foi utilizado em 16 (59,2%) dos pacientes e a profilaxia padrão para DECH (ciclosporina e metotrexate) foi utilizada em 15 (55,5%) dos pacientes. O dia de pega teve uma mediana de 19 e mínimo e máximo de 15 e 30, respectivamente. Quatro pacientes (14,8%) tiveram óbito antes da pega. Aproximadamente 63% (17 pacientes) apresentaram DECH aguda (em todos os estágios) e a taxa de mortalidade (TRM) foi de aproximadamente 44% dos casos (12 pacientes). Os pacientes que receberam TCTH de um doador aparentado tiveram TRM de aproximadamente 41% (7 pacientes) e os que receberam de um doador não aparentado foi de aproximadamente 45% (5 pacientes). A frequência dos antígenos HNA detectados nos doadores foi de 46,4% HNA-1a, 89,3% HNA-1b, 3,6% HNA-1c, 96,4% HNA-3a, 32,1% HNA-3b, 96,4% HNA-4a, 21,4% HNA-4b, 85,7% HNA-5a e 71,4% HNA-5b. A frequência dos anticorpos anti-HNA1a, anti-HNA1b, anti-HNA1c e anti-HNA2 no D0 foram respectivamente 46,4%, 42,9%, 42,9% e 53,6%. A associação entre a tipagem HNA dos doadores e anticorpos anti-HNAs receptores com dia da pega, DECH aguda e TRM não mostrou correlação estatisticamente significativa.

Conclusão. A frequência de HNA encontrados nos doadores está de acordo com o descrito pela literatura. Contudo, a frequência dos anticorpos anti-HNAs foi bastante alta na população do estudo, embora a maioria apresentasse doença há menos de 12 meses até o transplante. Apesar de não encontrarmos uma correlação, novos estudos são necessários para melhor avaliar o papel do HNA no desfecho do TCTH.

Palavras chave. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Doença enxerto-hospedeiro aguda. Aloantígeno neutrofílico humano.

ABSTRACT

Background and purpose. Hematopoietic cellular reconstruction with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an established method of treatment for a variety of hematological, oncologic and immunologic diseases. However, HSCT is associated with considerable morbidity and mortality due to recurrence of underlying disease, incomplete HLA compatibility, type of conditioning regimen and infection during the unavoidable period of neutropenia. This study investigates a surrogate cause of morbidity: compatibility of Human Neutrophil Antigens (HNA) between donors and receivers and its association with day of engraftment, incidence of acute graft versus host disease (GVHD) and total rate of mortality (TRM) in patients who underwent allogeneic HSCT.

Type of study and location. Prospective cohort study carried out at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

Methods. We have studied 27 patients who underwent HSCT between May, 2013 and April, 2014, and their respective donors. HNA typing in the donors was performed by PCR-SSP (One Lambda) and anti-HNA antibodies in receivers were detected using the LABSCREEN MULTI kit (LSMUTR-One Lambda).

Results. The age ranged from 1 to 63 years, with an average of 20.4 ± 17.5 years. Nineteen were pediatric patients (<21 years) with an average age of 10.05 ± 6.4 years, and among adult patients the average was 42.2 ± 12.6 years. There was a discreet male prevalence, 16 (59,3%). The acute leukemias were frequent in 19 (70,3%) of patients, other malignant onco-hematological diseases (Hodgkin Lymphoma and non-Hodgkin's Lymphoma) in 3 (11,1%) and non-malignant (myelodysplastic syndrome, osteopetrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplasia and granulomatous disease) in 6 (22,2%). Nineteen (70,3%) of the patients, had the disease for less than 12 months at the time of the transplant and 24 (88,9%)

were fully HLA compatible with their donors. Myeloablative conditioning regimen was used in 16 (59,3%) of the patients and the standard prophylaxis for GVHD (cyclosporine and methotrexate) was used in 15 (55,5%) of the patients. The day of engraftment had a median of 19 and minimum and maximum of 15 and 30, respectively. Four patients (14,8%) died before the engraftment. Approximately 17 patients (63%) showed acute GVHD (in all stages) and the total rate of mortality (TRM) was approximately 44% of the cases (12 patients). Patients who received HSCT from a related donor had TRM of approximately 41% (7 patients) and those who have received an unrelated donor was approximately 45% (5 patients). The frequency of HNA antigens detected in donors was 46,4% HNA-1a, 89,3% HNA-1b, 3,6% HNA-1c, 96,4% HNA-3a, 32,1% HNA-3b, 96,4% HNA-4a, 21,4% HNA-4b, 85,7% HNA-5a and 71,4% HNA-5b. The frequency of antibodies anti-HNA1a, anti-HNA1b, anti-HNA1c and anti-HNA2 at D0 were respectively 46,4%, 42,9%, 42,9% and 53,6%. The association between the HNA donor typing and anti-HNA antibodies of receivers with day of the engraftment, acute GVHD and TRM showed no statistically significant correlation.

Conclusion. The HNA frequency found in our donors was close to the described in the literature. The frequency of anti-HNAs antibodies, however, was quite high in our study population; although the majority presented the disease for less than 12 months before the transplant.

The association between HNA donor typing and anti-HNA antibodies of patients with day of engraftment, acute GVHD incidence and TRM showed no statistically significant correlation. As the number of cases was small, further studies with higher numbers and with antigen/antibodies assayed in both sides of transplantation pairs, are needed to better assess the role of the HNAs on the outcome of HSCT.

Key words. Hematopoietic stem cell transplantation. Transplant-related mortality. Graft versus host disease. Human neutrophil alloantigens.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico da DECH aguda _____	28
Tabela 2	Classificação clínica da DECH aguda _____	28
Tabela 3	Distúrbios causados por anticorpos anti-HNA e seus antígenos correspondentes _____	31
Tabela 4	Diferenças moleculares do sistema HNA-1, alelos e combinações de alelos _	33
Tabela 5	Nomenclatura atual e genética molecular dos HNAs _____	34
Tabela 6	Frequência dos antígenos HNA dos doadores suas associações com dia de pega, DECH aguda e TRM _____	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPSP	Célula progenitora do sangue periférico
CTH	Célula tronco hematopoiética
D0	Dia da infusão de células tronco hematopoiéticas
D+15	15 dias após a infusão de células tronco hematopoiéticas
D+30	30 dias após a infusão de células tronco hematopoiéticas
D+60	60 dias após a infusão de células tronco hematopoiéticas
D+90	90 dias após a infusão de células tronco hematopoiéticas
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
DLI	<i>Donor lymphocyte infusion</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic triphosphates</i>
dNTPs	<i>deoxynucleotide triphosphates</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetracetic Acid</i>
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNA	<i>Human Neutrophil Alloantigen</i>
INF- γ	<i>Interferon γ</i>
IPF	Idiopathic pulmonar fibrosis

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MO	Medula óssea
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
NMDP	<i>National Marrow Donor Program</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RIC	<i>Reduced Intensity Conditioning</i>
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	Sangue periférico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSO	<i>Sequence-specific Oligonucleotides</i>
SSP	<i>Sequence-specific Primers</i>
TAE	Tris Acetato EDTA
TBI	<i>Total Body Irradiation</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TMO	Transplante de medula óssea
TNF- α	Fator de necrose tecidual α
TRALI	<i>Transfusion – related acute lung injury</i>
TRM	<i>Transplant rate of mortality</i>

UV Ultra Violeta

VOD *Veno-occlusive disease*

* Algumas siglas foram mantidas na sua versão original em inglês, por serem assim internacionalmente conhecidas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)	16
2.1.1	Histórico	16
2.1.2	Modalidades de transplantes	17
2.1.3	Fontes de células	18
2.1.4	Triagem do doador	20
2.1.5	Regimes de condicionamento	21
2.1.6	Reconstituição imunológica	22
2.1.7	Complicações relacionadas ao TCTH	23
2.2	ALOANTÍGENO NEUTROFÍLICO HUMANO (HNA)	29
2.2.1	Antígenos HNA-1	31
2.2.2	Antígenos HNA-2	35
2.2.3	Antígenos HNA-3	36
2.2.4	Antígenos HNA-4 e HNA-5	36
3	JUSTIFICATIVA	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	GERAL	39
4.2	ESPECÍFICOS	39
5	METODOLOGIA	40
5.1	DELINEAMENTO	40

5.2	VIABILIDADE _____	40
5.3	LOGÍSTICA _____	40
5.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO _____	41
5.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO _____	41
5.6	NÚMERO DE PACIENTES _____	41
5.7	VARIÁVEIS EM ESTUDO _____	41
5.8	AMOSTRA _____	42
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	43
5.10	ASPECTOS ÉTICOS _____	44
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	45
7	ARTIGO ORIGINAL _____	53
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	68
	ANEXOS _____	69
	ANEXO I: PROTOCOLO DE COLATA DE DADOS _____	69
	ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido _____	70
	ANEXO III: Informação suplementar - Tabela 6: Frequência dos antígenos HNA dos doadores suas associações com dia de pega, DECH aguda e TRM _____	72

1 INTRODUÇÃO

Transplante de medula óssea (TMO) é a infusão de células tronco do sistema hematopoiético provenientes de um doador ou do próprio paciente. Essas células têm a capacidade de se replicar e de dar origem a todas as células sanguíneas maduras (SEBER, CASTRO JR. e DAUDT, 2007).

O termo “transplante de medula óssea” (TMO) tem progressivamente sido substituído por outros como “transplante de células tronco” ou “transplante de células hematopoiéticas”. A razão para esta mudança tem sido o progressivo uso de células tronco hematopoiéticas obtidas de outras fontes como o sangue periférico ou sangue de cordão umbilical (GRATWOHL *et al.*, 2002).

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) fornece terapia curativa para uma variedade de doenças (SAVANI e MOHTY, 2014) que podem ser tratadas em suas várias modalidades: singênico, autólogo ou alogênico; de medula óssea, de sangue periférico ou de cordão umbilical; de doadores aparentados ou não relacionados, imunogeneticamente compatíveis (HLA idêntico) ou incompatíveis, manipulados (com depleção de células T ou neoplásicas) ou não, utilizando regimes de condicionamento mieloablativos ou de intensidade reduzida (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

O principal obstáculo para o sucesso do transplante alogênico de medula óssea tem sido a falta de doador compatível adequado (SAVANI e MOHTY, 2014). As opções para doadores alogênicos são membros da família que tenham antígeno leucocitário humano (HLA) idêntico ou que tenham um único antígeno HLA incompatível com o paciente; indivíduos não relacionados que tenham HLA compatível ou um antígeno incompatível com o paciente;

membros da família que sejam haploidênticos (50% de compatibilidade HLA) com o paciente (SANDERS, 1997).

A gravidade das reações de alorreatividade, mediadas pelos antígenos HLA, praticamente restringiu, durante muitos anos, os TCTH a pares doador-receptor oriundos da mesma família, com identidade HLA. A ocorrência de significativa frequência da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), aguda ou crônica, e, em certas circunstâncias, de rejeição do enxerto, em TCTH HLA-idêntico, revelou a importância de um conjunto de antígenos não-HLA, denominados antígenos secundários de histocompatibilidade (*minor histocompatibility antigens, mHA*) (MULLIGHAN e BARDY, 2007).

Os aloantígenos de neutrófilos humanos (HNA) estão associados a várias condições clínicas como neutropenia imune neonatal, lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI), refratariedade à transfusão de granulócitos, reação transfusional febril, neutropenia imune após transplante de medula óssea, neutropenia auto-imune e neutropenia imune induzida por drogas (BUX, 2008). A identificação de antígenos e anticorpos neutrofílicos é relevante para o diagnóstico destes distúrbios (MORITZ *et al.*, 2009).

O presente trabalho tem como objetivo estudar a associação do genótipo HNA do doador e a presença de anticorpo anti-HNA do receptor com o tempo de pega, o desenvolvimento de DECH aguda e mortalidade associada ao procedimento até o 100º (centésimo) dia após a infusão de células tronco hematopoiéticas (D +100).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 130199.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS (TCTH).

O desenvolvimento do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), nas últimas décadas, permitiu o tratamento de doenças que, antes, eram invariavelmente fatais (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

2.1.1 Histórico

Em 1959 o pesquisador francês Georges Mathé restaurou com sucesso a hematopoese em seis adultos Iuguslavos vítimas de um acidente de radiação e, então, o primeiro TCTH parcialmente bem sucedido ocorreu. O TCTH tornou-se uma terapia reconhecida para outras formas de falência medular, e em 1968, ocorreu o primeiro transplante de medula óssea bem sucedido no mundo, feito em uma criança com síndrome da imunodeficiência combinada grave (BENDORF e KERRIDGE, 2011). A importância dessa abordagem terapêutica e de sua investigação clínica foi reconhecida com a atribuição do prêmio Nobel de Medicina, em 1990, ao Dr. E. Donnall Thomas, de Seattle, EUA, um dos pioneiros da introdução do TMO na espécie humana (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000). Após contínuas melhorias, o transplante alogênico de células tronco de um irmão HLA compatível tem sido o tratamento de escolha para várias doenças malignas e não malignas e é agora considerada a melhor opção terapêutica para muitas outras (GRATWOHL *et al.*, 2002). A sua indicação será sempre correta

se a sobrevida global e qualidade de vida forem significativamente melhores com o transplante do que com o tratamento convencional, em geral quimioterápico (SEBER, 2009).

2.1.2 Modalidades de transplantes

Os transplantes alogênicos podem ser categorizados de acordo com:

- I. A relação de parentesco entre o doador e o receptor
 - Singênico (gêmeo idêntico)
 - Relacionado (aparentado)
 - Não relacionado (não aparentado)
- II. O regime de condicionamento
 - Mieloablativo (usado para destruir a medula óssea do receptor)
 - Não mieloablativo (ou condicionamento de intensidade reduzida - RIC)
- III. O grau de compatibilidade imunológica (HLA) entre doador e receptor
 - HLA compatível
 - HLA não compatível
 - Haplo idêntico (compartilham o mesmo haplótipo) (BENDORF e KERRIDGE, 2011).

No TCTH singênico a identidade antigênica entre doador e receptor é absoluta e não se produz portanto, nenhuma complicação imunológica (AZEVEDO e RIBEIRO, 2000). Para pacientes que não possuem um irmão gêmeo, um irmão HLA compatível é a melhor escolha para o transplante de medula óssea alogênico. Mas, na falta de um doador compatível, existe a possibilidade de se encontrar um doador não relacionado HLA compatível ou um doador

relacionado que seja parcialmente compatível com o receptor (ARMITAGE, 1994). Doadores parcialmente compatíveis (mismatch) têm, em geral, um a dois antígenos HLA distintos (SEBER, CASTRO JR. e DAUDT, 2007).

Para muitos pacientes, encontrar um doador adequado para um TCTH alogênico é o principal desafio, e frequentemente um doador não relacionado compatível não é identificado em tempo de beneficiar o paciente. O uso de sangue de cordão é uma alternativa viável para pacientes que necessitam com urgência um doador não relacionado para TCTH. Outra alternativa é encontrar um doador com somente um haplótipo HLA idêntico, geralmente um dos pais, irmão ou filho (DEVETTEN e ARMITAGE, 2007).

2.1.3 Fontes de células

As fontes de células progenitoras hematopoéticas, atualmente utilizadas para transplante, são a medula óssea (MO), as células progenitoras de sangue periférico (CPSP) ou o sangue do cordão umbilical e placentário (SCUP) de um doador aparentado ou não (ANASETTI *et al.*, 1994; BENSINGER *et al.*, 1995; BOUZAS, 2000). A medula óssea alogênica e o sangue de cordão umbilical e placentário, geralmente, são usados para pacientes com malignidades hematológicas (BENSINGER *et al.*, 1994; SANDERS, 1997; BOUZAS, 2000).

A compatibilidade HLA necessária para o SCUP é menos rigorosa, como a incidência da (DECH) aguda e crônica quando comparada com o transplante de medula óssea (ROCHA *et al.*, 2000; DEVETTEN e ARMITAGE, 2007). A razão para a diminuição da incidência de DECH, é provavelmente, devido às células tronco hematopoiéticas derivadas do sangue de cordão serem mais imunologicamente “naive” (ingênuas) quando comparadas com as células

derivadas da medula óssea (DEVETTEN e ARMITAGE, 2007). Entretanto, o SCUP possui aproximadamente um log a menos de células progenitoras hematopoiéticas do que as outras fontes (GREWAL *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2010). O uso dessa fonte de células tronco hematopoiéticas (CTH) está associado a maior risco de falha de enxertia e maior lentidão na reconstituição hematopoiética e imune, com conseqüente maior período de neutropenia, maior necessidade de suporte transfusional, e maior duração da hospitalização (CORNETTA *et al.*, 2005; KERNAN *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010).

As células progenitoras de sangue periférico são coletadas de doadores saudáveis, após a mobilização com fatores de crescimento, e usadas como alternativa para substituir a medula óssea nos transplantes alogênicos, (AZEVEDO e RIBEIRO, 2000; CHAMPLIN *et al.*, 2000) e levam à recuperação medular mais rápida, quando comparadas com a MO (AZEVEDO *et al.*, 1995; AZEVEDO e RIBEIRO, 2000; CHAMPLIN *et al.*, 2000). A recuperação medular mais rápida é creditada ao maior número de células tronco (CD34+) existentes nas CPSPs (AZEVEDO e RIBEIRO, 2000).

Mais recentemente, há a tendência para uma maior incidência de DECH crônica em pacientes submetidos a transplantes alogênicos com CPSPs quando comparados a pacientes transplantados de M.O (ARAI e VOGELSANG, 2000).

Em algumas situações, as células tronco podem ser manipuladas, como para a depleção de linfócitos T. Os linfócitos T do doador são capazes de reconhecer o receptor como estranho e atacá-lo. Essa reação recebe o nome de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A retirada dos linfócitos antes do transplante preveniria a DECH, mas o procedimento é muito caro e não disponível no Brasil. Além disso, a depleção de linfócitos T está associada à maior chance de recidiva da doença do paciente (SEBER, CASTRO JR. e DAUDT, 2007).

2.1.4 Triagem do doador

A seleção do doador com grau adequado de compatibilidade representa uma das estratégias essenciais para o sucesso do TCTH. Dentre os fatores genéticos que exercem maior influência no resultado desses transplantes estão os genes do sistema HLA, caracterizados por extenso polimorfismo. O reconhecimento da ação fundamental da alogenicidade das moléculas HLA na evolução pós transplante levou a necessidade de identificação das variantes alélicas dos genes HLA, no paciente e nos seus potenciais doadores (PEREIRA *et al.*, 2010).

Tem sido dada preferência para o doador com consanguinidade alélica 8x8 (A, B, C, DRB1). Na presença de incompatibilidade em classe I sugere-se a busca de doador com compatibilidade DQB1 (9x10). Já as incompatibilidades dos *locus* DPB1 não constituem critério de exclusão de doador, exceto quando existir presença de anticorpo contra o *locus* HLA-DP do receptor (PEREIRA *et al.*, 2010).

A falência de enxertia no transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TCTH) pode ser mediada por células T e NK do hospedeiro contra o doador ou por aloanticorpos doador específico (DSA). A produção de anticorpos HLA é influenciada por vários fatores: sensibilização prévia (gestação, transfusão e transplantes prévios), nível de incompatibilidades HLA entre doador e receptor, perfil imune e doença original (TORRES *et al.*, 2010).

De todas as fontes de células potenciais para o TCTH alogênico, o doador HLA aparentado totalmente compatível continua contribuindo para as melhores taxas de sobrevida global e livre de progressão (SYMONS e FUCHS, 2008).

Nos casos de doadores parcialmente compatíveis, o HLA do doador apresentará alguns locos diferentes do paciente. No caso do haploidêntico, o doador tem o haplótipo (50%) compatível com o receptor (SZYDLO *et al.*, 1997).

2.1.5 Regimes de condicionamento

Os regimes de condicionamento para o transplante de medula óssea alogênico devem imunossuprimir adequadamente o receptor para evitar a rejeição das células da medula do doador, devem destruir as células progenitoras malignas ou defeituosas, juntamente com progenitores hematopoiéticos normais, e causar pouca toxicidade (COPELAN, 1992).

A imunoablação é ampla, profunda e prolongada, o que, junto com a mieloablação, produz pancitopenia hematopoética e imunocitopenia e acarreta infecções oportunistas frequentes e graves, que comprometem seriamente o resultado dos transplantes (VOLTARELLI e STRACIERI, 2000). Sem a infusão de células tronco hematopoéticas, este tratamento levaria à morte por dano irreversível à medula óssea (SEBER, CASTRO JR. e DAUDT, 2007).

Os regimes de intensidade reduzida (RIC) - não mieloablativo ou minitransplante - são baseados na tentativa de evitar a alta morbidade e mortalidade associadas com o condicionamento padrão em pacientes com idade avançada ou comorbidades. Ele também pode usar o potencial de infusão de linfócitos do doador (DLI) para a mudança de quimerismo misto para quimerismo completo. O objetivo do RIC não é a erradicação do tumor ou a destruição da hematopoese do receptor pela terapia citotóxica mas via imune mediada. O efeito do enxerto contra tumor é baseado em vários componentes: condicionamento inicial, composição do enxerto, prevenção da rejeição pós transplante e o uso de DLI em caso de quimerismo misto

em tempos específicos. O impacto na DECH e complicações infecciosas é menor e está associado com um aumento no risco de recaída pós transplante (GRATWOHL e CARRERAS, 2012).

2.1.6 Reconstituição imunológica

A recuperação funcional dos linfócitos e das células imunes efectoras ocorre gradualmente, podendo demorar um ano ou mais para o receptor desenvolver uma imunidade celular e humoral adequada (REIS e VISENTAINER, 2004). Esta recuperação é dependente de fatores que envolvem a idade do receptor, a patologia inicial, as diferenças no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e em antígenos de histocompatibilidade secundários, a depleção das células T, a terapia de condicionamento e prevenção da DECH, as complicações pós- transplante tanto na DECH aguda como crônica, bem como a recaída de doenças e estados infecciosos prévios ao transplante. Esta deficiência imune que persiste por anos em pacientes que recebem o TCTH alogênico é uma das principais causas de morbidade e mortalidade (ATKINSON *et al.*, 1990; OCHS *et al.*, 1995). Embora o reaparecimento de neutrófilos e plaquetas seja considerado o ponto inicial da recuperação hematológica, após intensa quimio e/ou radioterapia e o transplante de medula, a reconstituição imunológica é um componente essencial desta etapa para o sucesso do transplante, (MILLER *et al.*, 1999; RAAPHORST, 1999; SPANGRUDE e COOPER, 2000; REIS e VISENTAINER, 2004) a qual tem papel essencial na defesa contra agentes patogênicos. (ATKINSON *et al.*, 1982; PARKMAN e WEINBERG, 1997).

Os neutrófilos presentes no inóculo do doador têm um pequeno impacto no número de células circulantes no receptor, embora, linfócitos maduros presentes no enxerto tenham

demonstrado contribuir funcionalmente para a imunidade do receptor no período pós-transplante (WITHERSPOON *et al.*, 1986; REIS e VISENTAINER, 2004)

No geral, o padrão de reconstituição imune em pacientes submetidos ao TCTH alogênico é o surgimento de células T CD4⁺CD4RO⁺ (subpopulações de linfócitos T CD4⁺ associadas com a memória) nos primeiros dias após o transplante; a inversão da razão CD4⁺CD8⁺ nos dias que se seguem; e, a rápida normalização da contagem de células NK (CD16⁺CD56⁺). Com relação à produção de anticorpos, a ativação, proliferação e secreção de IgM gradualmente retorna ao normal. A única anormalidade que persiste por mais de um ano após o transplante é a produção insuficiente de IgG e IgA. No entanto, algumas complicações que ocorrem após o transplante podem interferir na recuperação imunológica do receptor, aumentando este tempo para três anos ou mais (REIS e VISENTAINER, 2004).

Usualmente, as contagens de leucócitos caem abaixo de 100 células/mm³ por volta do D+4, dependendo do tipo de condicionamento utilizado e da doença de base (REIS e VISENTAINER, 2004). Considera-se que a medula infundida *pegou*, ou que houve *enxertia*, quando o paciente mantém mais de 500 granulócitos/mm³ por três dias consecutivos, o que ocorre geralmente entre os dias +10 e +20 (SEBER, CASTRO JR. e DAUDT, 2007). A recuperação da função medular é influenciada por outros fatores como o tipo de transplante, número de células infundidas e infecções (VOLTARELLI e STRACIERI, 2000).

2.1.7 Complicações relacionadas ao TCTH

Além do problema da grave e prolongada imunossupressão, o transplante de medula óssea está associado com várias outras complicações. Estas incluem condições que não foram

previamente reconhecidas e outras que, em associação com o transplante de medula óssea, fornece novas percepções sobre doenças previamente conhecidas (ARMITAGE, 1994).

As complicações decorrentes do período de aplasia são as infecções, os sangramentos e a anemia. Hemoderivados e terapêutica antimicrobiana são utilizados até a recuperação hematológica (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

A **mucosite** ocorre em praticamente todos os pacientes transplantados, acometendo o trato gastrintestinal, variando desde uma hiperemia da mucosa até ulcerações provocadas pelo regime de condicionamento, é caracterizada pela presença de dor, inicialmente desencadeada pela deglutição, frequentemente requerendo o uso de analgésicos opióides (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

Náuseas, vômitos e diarreia são complicações frequentes durante e após a quimioterapia de condicionamento. Vômitos tardios podem estar associados a DECH ou infecções por CMV (ARAI e VOGELSANG, 2000).

Cistite hemorrágica causada por toxicidade de drogas urotóxicas, tanto no regime de condicionamento, quanto no suporte pós transplante ou infecções virais (CARRERAS, 2012). Pode ser causada também por infecções virais do trato urinário, especialmente as causadas pelo Adenovírus e pelos poliomavírus (vírus BK e JC) e, menos frequentemente, pelo CMV (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

Doença venoclusivahepática (VOD) é o termo usado para designar os sinais e sintomas que aparecem logo após o TCTH como consequente toxicidade hepática relacionada ao regime de condicionamento (CARRERAS, 2012). Se caracteriza por hepatomegalia ou dor na região do hipocôndrio direito, ganho de peso sem causas aparentes e hiperbilirrubinemia (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

Complicações pulmonares caracterizadas por febre, infiltrados pulmonares, hipóxia, desconforto respiratório e por hemorragia alveolar difusa de etiologia desconhecida (ARMITAGE, 1994).

A **toxicidade cardíaca** está associada, principalmente, ao uso de altas doses de ciclofosfamida que podem provocar arritmias, pericardite hemorrágica e até insuficiência cardíaca congestiva (PATON, COUTINHO e VOLTARELLI, 2000).

A **doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda** permanece, direta ou indiretamente, a principal causa de mortalidade a curto prazo (até D+100) após TCTH alogênico (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

A DECH é causada pela reação de células T maduras enxertadas no inóculo da medula com aloantígenos do receptor. Ela ocorre quando o receptor é imunocomprometido e, portanto, incapaz de rejeitar as células alogênicas no enxerto. Na maioria dos casos, a reação é dirigida contra antígenos de histocompatibilidade menores do receptor porque o transplante de medula óssea, geralmente, não é realizado quando o doador e o receptor têm diferenças em suas moléculas do MHC (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

Vários critérios são tradicionalmente necessários para diagnosticar DECH aguda:

- O enxerto deve conter células imunologicamente competentes;
- O receptor deve possuir antígenos que não estão presentes no doador do enxerto para que ele pareça estranho ao enxerto, e portanto, estimular antígenicamente células imunologicamente ativas do enxerto;
- O receptor deve ser incapaz de montar uma reação imunológica eficaz contra o enxerto (AZEVEDO, 2010).

A patologia da DECH aguda tem sido atribuída a um processo de três fases, compreendido pelo dano tecidual inicial causado pelo regime de condicionamento que, por sua

vez, leva a ativação das células apresentadoras de antígenos do receptor e ativação e proliferação das células T do doador (fase aferente) e a liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e fator de necrose tecidual (TNF α) que eventualmente produz necrose do tecido (fase eferente). A ação deste processo patogênico na indução de DECH aguda é modulado, em parte, pela presença de células capazes de inibir respostas imunes, principalmente células T-reguladoras (T-regs) (APPERLEY e MASSZI, 2012).

A DECH aguda é o resultado de um efeito aloimune (APPERLEY e MASSZI, 2012). Similar a todas as respostas imunes, certos gatilhos são críticos para a indução de DECH aguda (PACZESNY *et al.*, 2010). Estes incluem:

- A incidência aumenta com doadores não aparentados quando comparada com doadores aparentados (AZEVEDO, 2010);
- Com a crescente disparidade HLA, a incidência e a severidade aumentam (AZEVEDO, 2010);
- Idade avançada do paciente (APPERLEY e MASSZI, 2012);
- Diferença de sexo, o uso de doadoras femininas para receptores masculinos (AZEVEDO, 2010);
- Aloimunização prévia do doador, incluindo gestações (ARAI e VOGELSANG, 2000; DHIR, SLATTER e SKINNER, 2014);
- Após a quimioterapia em altas doses, os níveis circulantes de citocinas aumentam. Essas citocinas são capazes de aumentar a capacidade do enxerto de reconhecer e reagir contra antígenos dos receptores (AZEVEDO, 2010);
- Danos causados pela doença de base (PACZESNY *et al.*, 2010);
- Regimes de condicionamento incluindo irradiação corporal total (TBI) estão associados com um aumento na incidência e gravidade da DECH aguda em comparação com quimioterapia isoladamente (AZEVEDO, 2010);

- Profilaxia da DECH com Ciclosporina e altas doses de células CD34+ aumentam o risco de DECH aguda (ARAI e VOGELSANG, 2000).

A DECH ocorre nos primeiros três meses que se seguem ao TCTH, frequentemente entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia. Os principais órgãos acometidos são o sistema imune, pele, fígado, trato gastrointestinal e pulmões (GLUCKSBE *et al.*, 1994). As manifestações cutâneas são em geral o primeiro sinal, caracterizadas por eritema nas palmas e plantas, precedido comumente por sensação de queimação ou prurido. Com a progressão da doença, exantema maculopapular envolve tórax, pescoço, bochechas e coloração violácea das orelhas (GLUCKSBE *et al.*, 1974; SILVA, BOUZAS e FILGUEIRA, 2005). Acometimento mucoso é dificilmente distinguível da mucosite induzida pela quimioterapia (DEEG e STORB, 1984; SILVA, BOUZAS e FILGUEIRA, 2005). O estadiamento clínico da DECH aguda pode ser caracterizado de acordo com a **tabela 1**.

A DECH pode ser graduada de acordo com a gravidade e o prognóstico está relacionado com a graduação clínica (PRZEPIORKA *et al.*, 1995). A classificação clínica da DECH aguda pode ser caracterizada pela **tabela 2**

Tabela 1 - Estadiamento clínico da DECH aguda

Estágio	Achados cutâneos	Fígado (nível de bilirrubina em mg/dL)	Intestinal
+	Exantema maculopapular em < 25% da superfície corporal	2 - 3	Diarréia 500-1000 mL/d persistente ou náuseas ≤ 15mL/Kg/d (crianças)
++	Exantema maculopapular em 25%-50% da superfície corporal	3 - 6	Diarreia 1000-1500 mL/dia > 15mL/Kg/d (crianças)
+++	Eritrodermia generalizada	6 - 15	Diarreia > 1500 mL/dia > 20mL/Kg/d (crianças)
++++	Descamações e bolhas	>15	Dor com ou sem obstrução ≥ 20mL/Kg/d (crianças)

Fonte: modificado de (AZEVEDO, 2010)

Tabela 2 - 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: modificado de(AZEVEDO, 2010)

A profilaxia é feita com drogas imunossupressoras como Ciclosporina, Metotrexate e Tacrolimus. Usualmente a DECH grau I não é tratada. Doenças grau II a III são tratadas com associação de metil-prednisolona. Em caso de doença grave pode-se utilizar Micofenolatomofetil e Anti – timoglobulina (PETERS *et al.*, 2000).

A DECH aguda graus III – IV tem um prognóstico extremamente pobre apesar da intervenção terapêutica e conseqüentemente esforços consideráveis são feitos para tentar prevenir sua ocorrência (APPERLEY e MASSZI, 2012).

Um dos principais benefícios do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é a indução do efeito enxerto contra leucemia (GVL – graft versus leucemia) ou enxerto contra tumor (GVT – graft versus tumor) (MORECKI *et al.*, 2009). Este é um importante mecanismo terapêutico do TCTH alogênico o qual é mediado, principalmente, por células NK e T alorreativas (SUZUKI *et al.*, 2008).

A **DECH crônica** ocorre três meses ou mais após o transplante, resultante de DECH aguda ativa (forma progressiva), após intervalo livre de doença (forma quiescente) ou sem DECH aguda prévia (forma de novo). Quanto à extensão é classificada como localizada, quando só pele e/ou envolvimento hepático estão presentes, e como extensa, quando outros órgãos estão envolvidos (SILVA, BOUZAS e FILGUEIRA, 2005).

2.2 ALOANTÍGENO NEUTROFÍLICO HUMANO (HNA)

Desde o início do século XX, pesquisadores têm observado que o soro de alguns pacientes causava aglutinação de leucócitos de outros indivíduos. Anticorpos anti-granulócitos têm sido detectados no soro de pessoas politransfundidas, mulheres após gravidez, pacientes

com neutropenia, pacientes com reação transfusional febril e no sangue de doadores que causou reação de transfusão pulmonar no receptor (BUX, 2008; MORITZ *et al.*, 2009).

Aloantígenos neutrofílicos humanos (HNAs) são moléculas de superfície de neutrófilos, polimórficas e imunogênicas e determinadas geneticamente. Embora estes ‘grupos sanguíneos’ sejam restritos principalmente aos neutrófilos, alguns são também expressos em outras células. Indivíduos podem desenvolver anticorpos anti-HNA se seu sistema imune entrar em contato com um HNA externo (durante gravidez ou transfusão). Anticorpos anti-HNA estão envolvidos em uma diversidade de doenças aloimunes e autoimunes, por exemplo, neutropenia alo e autoimune, reação transfusional febril e lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI) (**tabela 3**) (MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011).

Anticorpos contra HNA e HLA classe I (HLA classe II raramente são expressos em neutrófilos) podem causar TRALI (REIL *et al.*, 2008; VELDHUISEN *et al.*, 2014). Aloanticorpos maternos da classe IgG contra HNA podem atravessar a placenta e causar neutropenia aloimune fetal/neonatal (NAIN) (VELDHUISEN *et al.*, 2014). Além disso, autoanticorpos contra neutrófilos causando neutropenia autoimune (em crianças pequenas conhecida como neutropenia benigna da infância) são frequentemente dirigidos contra Fc γ RIIIb ou os antígenos HNA-1 localizados neste receptor (BUX *et al.*, 1992; BRUIN *et al.*, 2005; VELDHUISEN *et al.*, 2014).

Os antígenos neutrofílicos humanos (HNAs) são subdivididos em cinco sistemas (HNA-1 a HNA-5). Onze antígenos foram descritos até agora (VELDHUISEN *et al.*, 2014).

Tabela 3 - Distúrbios causados por anticorpos anti-HNA e seus antígenos correspondentes

Doença mediada por anticorpo anti-HNA	Antígenos alvo envolvidos
Neutropeniaaloimune neonatal	HNA-1, HNA-2, HNA-3a, HNA-4a, HNA-5 ^a
Neutropenia autoimune	HNA-1a, HNA-4 ^a
Lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI)	HNA-1, HNA-2, HNA-3 ^a
Neutropenia imune induzida por drogas	FcγRIIIb
Neutropeniaaloimune após transplante de medula óssea	HNA-2
Reação transfusional febril	HNA-3 ^a

Fonte: modificado de (MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011)

2.2.1 Antígenos HNA-1

Estão localizados na glicoproteína FcγRIIIb de baixa afinidade com o receptor de IgG1/IgG3, CD16b, e são expressos somente em neutrófilos (HUIZINGA *et al.*, 1990; TROUNSTINE *et al.*, 1990; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). Neutrófilos que não expressam a proteína FcγRIIIb possuem fenótipo HNA-1 nulo (HUIZINGA *et al.*, 1990; BUX, 2008). Indivíduos que possuem o fenótipo nulo não sofrem de doenças autoimune ou imune ou um aumento de infecções (DEHAAS *et al.*, 1995; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). FcγRIIIb e antígenos HNA-1 são expressos em todos neutrófilos segmentados, aproximadamente metade dos metamielócitos e 10% mielócitos (STRONCEK *et al.*, 1998).

FcγRIIIb é codificada pelo gene FCGR3B (cinco exons, 699pb) localizado no cromossomo 1q23-24 (MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). Quatro antígenos são descritos para o HNA-1 (VELDHUISEN *et al.*, 2014). O polimorfismo HNA-1a/HNA-1b se origina a partir da substituição de cinco nucleotídeos (141, 147, 227, 277 e 349), levando a

substituição de quatro aminoácidos (posições 36, 65, 82 e 106) (**tabela 4**) (ORY *et al.*, 1989; RAVETCH E PERUSSIA, 1989; BUX, 2008; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). O alelo HNA-1c e HNA-1d são mais recentes, e ocorrem somente em indivíduos HNA-1b. Isto é causado por uma única mutação na posição 266 do gene FCGR3B que causa a expressão de HNA-1c ou HNA-1d junto ao HNA-1b (VELDHUISEN *et al.*, 2014). Assim indivíduos homozigotos para o gene que codifica o HNA-1a não têm expressão de HNA-1b, HNA-1c e HNA-1d (REIL *et al.*, 2013). Devido a duplicação do gene FCGR3B, como encontrado em indivíduos HNA-1c positivos, o alelo FCGR3B*01 (HNA-1a) e o alelo FCGR3B*03 (HNA-1b e HNA-1c) são expressos no mesmo cromossomo (KOENE *et al.*, 1998; STEFFENSEN *et al.*, 1999; VELDHUISEN *et al.*, 2014). Isto ocorre, provavelmente, devido a um desigual *crossing over* através do qual o FCGR3B*03 se liga com FCGR3B*01 no mesmo cromossomo (STEFFENSEN *et al.*, 1999; REIL *et al.*, 2013). Indivíduos portadores deste haplótipo em conjunto com o alelo FCGR3B*02 (expressando HNA-1b e HNA-1d) no outro cromossomo irá expressar todos quatro antígenos do sistema HNA-1 (**tabela 5**) (VELDHUISEN *et al.*, 2014).

Indivíduos HNA-1a tem uma maior afinidade para IgG1 e IgG3 levando a um aumento da fagocitose mediada por neutrófilos de partículas opsonizadas comparada com indivíduos HNA-1b (ORY *et al.*, 1989; ORY *et al.*, 1991; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). Conseqüentemente, indivíduos HNA-1a positivos tem uma maior suscetibilidade a fibrose pulmonar idiopática (IPF) devido ao menor limiar de ativação de seus neutrófilos para IgG1 e IgG3 (BOURNAZOS *et al.*, 2010). Além disso, há fraca associação dos polimorfismos do sistema HNA-1 com a gravidade de várias doenças imunes (BOURNAZOS *et al.*, 2009; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011).

Utilizando técnica de citometria de fluxo para detectar o fenótipo de doadores de sangue saudáveis, brasileiros foi encontrado a frequência de 65% e 83% para HNA-1a e HNA-1b respectivamente (MORITZ *et al.*, 2009).

Tabela 4 -Diferenças moleculares do sistema HNA-1, alelos e combinações de alelos

Códon (posição do aminoácido)	36	38	65	78	82	106
Posição do nucleotídeo	141	147	227	266	277	349
FCGR3B*01	arg AGG	leu CTC	asn AAC	ala GCT	asp GAC	Val GTC
FCGR3B*02	ser AGC	leu CTT	ser AGC	ala GCT	asn AAC	Ile ATC
FCGR3B*03	ser AGC	leu CTT	ser AGC	asp GAT	asn AAC	Ile ATC
Alelos e combinações de alelos	Fenótipos codificados					
FCGR3B*01	HNA-1 ^a					
FCGR3B*02	HNA-1b e HNA-1d					
FCGR3B*03 ^a	HNA-1c e HNA-1b					
FCGR3B*01 + FCGR3B*03 ^b	HNA-1a e HNA-1b e HNA-1c					
deleção do gene FCGR3B	HNA-1 nulo					

Fonte: modificado de (BUX, 2008) a: resultante da mutação no alelo FCGR3B*02; b: duplicação do gene

Tabela 5 - Nomenclatura atual e genética molecular dos HNAs

Sistema	Antígeno	Gene	Exon	Nucleotídeo
HNA-1	HNA-1a (NA1)	<i>FCGR3B</i>	3	141G 147C 227A 266C 277G 349G
	HNA-1b (NA2)	<i>FCGR3B</i>	3	141C 147T 227G 266A/C 277A 349A
	HNA-1c (SH)	<i>FCGR3B</i>	3	141C 147T 227G 266A 277A 349A
	HNA-1d	<i>FCGR3B</i>	3	141C 147T 227G 266C 277A 349A
HNA-2	HNA-2 (NB1)	<i>CD177</i>	-	-
HNA-3	HNA-3a (5a)	<i>SLC44A2</i>	7	461G
	HNA-3b (5b)	<i>SLC44A2</i>	7	461A
HNA-4	HNA-4a (Mart)	<i>ITGAM</i>	3	230G
	HNA- 4b	<i>ITGAM</i>	3	230A
HNA-5	HNA-5a (Ond)	<i>ITGAL</i>	21	2372G/2120G ^a
	HNA-5b	<i>ITGAL</i>	21	2372C/2120C ^a

Fonte: modificado de (CHU et al., 2013; VELDHUISENet al., 2014)

a: duas diferentes isoformas

2.2.2 Antígenos HNA-2

A única característica do HNA-2 é sua expressão somente em subpopulações de neutrófilos. Indivíduos HNA-2 negativos e subpopulações de neutrófilos HNA-2 negativos de indivíduos HNA-2 positivos mostram um fenótipo HNA-2 nulo, isto é, seus neutrófilos são deficientes de glicoproteínas transportadora (KISSELE *et al.*, 2002; BUX, 2008). Os aloanticorpos formados pelos indivíduos HNA-2 negativos são portanto isoanticorpos (BUX, 2008).

Indivíduos HNA-2 nulos que produzem isoanticorpos anti-HNA2, o podem sofrer uma prolongada neutropenia aloimune em recém nascidos e em receptores aloimunizados após transplante de medula óssea / células tronco (BUX, 2008; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011). Anticorpos anti-HNA-2 podem também induzir TRALI (BUX *et al.*, 1996; MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011).

HNA-2a (NB1) é caracterizado como uma glicoproteína ligada à membrana das células via uma GPI âncora. É expresso pelo gene *CD177* exclusivamente em neutrófilos e pode ser encontrado na membrana plasmática e na membrana de grânulos secundários (específicos) e vesículas secretoras (GOLDSCHMEDING *et al.*, 1992). Tem uma expressão maior em mulheres (63%) do que em homens (53%) e parece diminuir em mulheres mais velhas mas não em homens, sugerindo que o estrógeno pode influenciar na expressão de HNA-2. Isto está de acordo com a conclusão de que a expressão de HNA-2 aumenta na gravidez (CARUCCIO *et al.*, 2003; BUX, 2008).

Estudos fenotípicos com citometria de fluxo mostram que a frequência do HNA-2a em brasileiros é semelhante a encontrada em norte-americanos e europeus que é em torno de 97% (BUX, 2008).

2.2.3 Antígenos HNA-3

O bialélico sistema HNA-3 (3a e 3b, antigos 5a e 5b) está localizado em uma proteína transportadora de colina-like (CTL2) (GREINACHER *et al.*, 2010), uma proteína transmembrana codificada pelo gene *SLC44A2* no cromossomo 19p13.1 (CURTIS *et al.*, 2010; GREINACHER *et al.*, 2010). É expresso por neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T e plaquetas (BUX, 2008).

Negatividade para HNA-3a é raro em todas as etnias. Aloanticorpos anti-HNA3 estão envolvidos na reação transfusional febril, neutropenia imune neonatal (DE HAAS *et al.*, 2000) e casos graves de TRALI (SILLIMAN *et al.*, 2007; REIL *et al.*, 2008). Um SNP (G461A) trocando uma arginina por uma glutamina na posição 154 da proteína é responsável pela diferença entre HNA-3a e HNA-3b (CURTIS *et al.*, 2010; GREINACHER *et al.*, 2010). A imunogenicidade do HNA-3b é menor que do HNA-3a (MUSCHTER, BERTHOLD e GREINACHER, 2011).

Foi encontrado uma frequência de 95% de HNA-3a entre doadores de sangue brasileiros saudáveis (MORITZ *et al.*, 2009).

2.2.4 Antígenos HNA-4 e HNA-5

HNA-4 e HNA-5 são partes das subunidades da integrina α M (CD11b) e α L (CD11a) respectivamente, as quais formam heterodímeros com a subunidade β 2 da integrina (CD18) (KLINE *et al.*, 1986; SIMSEK *et al.*, 1996; MORITZ *et al.*, 2009). HNA-4 é codificado pelo gene *ITGAM* e HNA-5 pelo gene *ITGAL*, ambos localizados no cromossomo 16p11.2. α M/ β 2-

integrina é uma proteína transmembrana expressa na superfície de neutrófilos, monócitos, células NK e leucócitos e está envolvida na adesão, transmigração, fagocitose e citotoxicidade (HARRIS *et al.*, 2000; BUX, 2008; VELDHUISEN *et al.*, 2014). α L/ β 2-integrina é uma molécula de adesão específica de leucócitos envolvida nas interações dos leucócitos. A maioria da população é positiva para HNA-4a (Mart) e somente uma pequena parte da população expressa o antígeno HNA-4b (XIA *et al.*, 2011). A diferença entre os antígenos é causada por um único SNP na posição 230 do gene, trocando uma arginina por uma histidina na proteína. O gene *ITGAL* codifica os antígenos HNA-5, consiste de duas isoformas de 5226 pb (31 exons) e 4974 pb (29 exons) respectivamente. A diferença entre os antígenos HNA-5a e HNA-5b é causada por uma mutação na posição 791 (exon 21, isoforma 1) ou posição 707 (exon 19, isoforma 2). A maioria da população (85%) é positiva para HNA-5a (Ond), enquanto aproximadamente 25% expressa o antígeno HNA-5b (SACHS *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm mostrado que os anticorpos contra antígenos de neutrófilos humanos (HNA) são capazes de estimular reações transfusionais, auto-ímmunes e neutropenia neonatal

Não existem estudos identificando a frequência de HNA (antígeno e anticorpo) em doadores e pacientes submetidos ao TCTH e seu possível impacto no desfecho do procedimento. A investigação desta relação poderia introduzir uma nova ferramenta na seleção de doadores de células tronco hematopoiéticas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Determinar a frequência de HNA em pacientes pediátricos submetidos ao TCTH alogênico e seus doadores.

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a presença antigênica e genotípica de HNA no TCTH;

Avaliar a importância para o dia da pega;

Avaliar associação com DECH aguda;

Avaliar possível associação com mortalidade relacionada ao transplante.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO

Estudo de coorte prospectivo onde foram avaliados pacientes submetidos ao TCTH no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período do estudo e que assinaram o TCLE ou que os pais e/ou responsáveis autorizaram e assinaram o TCLE. Em um primeiro momento foi delineado um estudo onde seriam incluídos somente pacientes até 21 anos. Mas, para ampliar os dados de correlação e frequência, foram incluídos também pacientes adultos, já que não se conhece ou se espera resposta diversa entre adultos e crianças.

5.2 VIABILIDADE

Este estudo foi desenvolvido com a colaboração do serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre.

5.3 LOGÍSTICA

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) foi coletado um tubo de sangue do doador e do paciente pré-TCTH (D0). Após o TCTH foi coletado um tubo de sangue do paciente nos momentos D+15, D+30, D+60 e D+90.

Após a coleta, todas as amostras foram levadas para o laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre para armazenamento e realização dos testes previstos para cada amostra.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos pacientes submetidos ao TCTH que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE. Ou que, os pais e/ou responsáveis, autorizaram e assinaram o TCLE.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes que aceitaram participar do estudo mas que não assinaram o TCLE.

5.6 NÚMERO DE PACIENTES E DOADORES

Por ainda não existirem dados na literatura indicando a frequência de HNA em doadores e receptores de TCTH foi incluído no estudo o maior número possível de amostras dentro do prazo hábil para coletas. O n calculado foi de, no mínimo, 20 pares doador/receptor durante o período de execução do projeto.

5.7 VARIÁVEIS EM ESTUDO

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes: idade, sexo, presença de DECH aguda, taxa de mortalidade no D+100, tipagem HNA do doador, presença de anticorpo anti-HNA do receptor nos dias D0, D+15, D+30, D+60 e D+90, dia de pega, compatibilidade HLA doador/receptor, quimerismo, tipo de condicionamento, tipo de profilaxia para DECH e doença de base.

5.8 AMOSTRAS

Extração de DNA

Amostras de sangue periférico dos doadores foram coletadas através de punção venosa, em tubos vacutainer contendo EDTA como anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, a partir da qual o DNA foi extraído usando o kit Maxwell 16 Blood DNA Purification System (Promega) seguindo as orientações do fabricante.

Tipagem HNA dos doadores por PCR - SSP

A tipagem HNA foi realizada pelo método PCR – SSP utilizando o kit HNA GenotypingTray (HNAGEN – One Lambda). Este kit permite a identificação dos genótipos HNA-1, HNA-3, HNA-4 e HNA-5.

Para amplifica

ção do DNA, preparou-se uma mistura padrão contendo tampão, dNTPs, Taq polimerase, DNA genômico (20 – 100ng/μL) e adicionou-se no termociclador.

As condições de temperatura para a reação de PCR foram de 2 minutos de desnaturação a 96°C, e de mais 60s a 63°C. Após, 9 ciclos de 10s a 96°C e de 60s a 63°C. Seguidos de 20 ciclos de 10s a 96°C, 50s a 59°C e 30s a 72°C.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2,5% (p/v) em tampão tris acetato EDTA (TAE). A corrida eletroforética durou 4 minutos à 140V, em temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas em luz UV através da coloração do brometo de etídeo.

Amostras dos pacientes

Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas através de punção venosa, em tubos vacutainer sem anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas e o soro foi aliquoteado em flaconetes a partir do qual foi realizado o teste de detecção de anticorpos.

Detecção de anticorpos anti- HNA dos pacientes

Os anticorpos anti - HNA foram detectados usando o kit LABSCREEN MULTI (LSMUTR – OneLambda). Foram detectados anti-HNA-1 e anti-HNA-2.

A incubação do soro dos pacientes com as “beads” contidas no kit e todos os passos seguintes foram realizados de acordo com as instruções da bula do kit. Os anticorpos do soro que se ligaram às “beads” foram marcados com conjugado PE – anti IgG humana que permite a leitura no aparelho Luminex. A análise dos resultados foi feita no software HLA Fusion LAB Screen, o qual fez a coleta dos dados e a determinação dos anticorpos presentes.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando a versão 18 do software SPSS. As frequências foram comparadas utilizando Qui-Quadrado com teste exato de Fisher. Foi utilizado Mann-Whitney para realizar comparações entre os grupos de variável dependente não paramétrica e Kruskal-Wallis para comparar as variáveis independentes não paramétricas.

5.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo é baseado no uso de amostras captadas voluntariamente de doadores e pacientes submetidos ao TCTH. Para isso todos os pesquisadores assinaram um termo de compromisso para uso de dados e os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre antes de ser iniciado (130199).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 p.

ANASETTI, C. *et al.* Marrow transplants from hla matched unrelated donors - an NMDP update and the seattle experience. **Bone Marrow Transplantation**, v. 13, n. 6, p. 693-695, Jun 1994.

APPERLEY, J.; MASSZI, T. Graft-versus-host disease. In: APPERLEY, A. *et al* (Ed.). **Haematopoietic Stem Cell Transplantation: The EBMT Handbook**. 6th: ESH-EBMT, 2012. cap. 13, p.216-233.

ARAI, S.; VOGELSANG, G. B. Management of graft-versus-host disease. **Blood Reviews**, v. 14, n. 4, p. 190-204, Dec 2000.

ARMITAGE, J. O. Bone-marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 12, p. 827-838, Mar 24 1994.

ATKINSON, K. *et al.* Analysis of late infections after human-bone marrow transplantation - role of genotypic nonidentity between marrow donor and recipient and of nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft versus host-disease. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 714-720, 1982 1982.

_____. Risk-factors for chronic graft-versus-host disease after hla-identical sibling bone-marrow transplantation. **Blood**, v. 75, n. 12, p. 2459-2464, Jun 15 1990.

AZEVEDO, W. Doença enxerto versus hospedeiro aguda A- GVHD. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 16-21, 2010-05 2010.

AZEVEDO, W.; RIBEIRO, M. C. C. Sources of hematopoietic stem cells for transplantation. **Medicina (Ribeirao Preto)**, v. 33, n. 4, p. 381-389, Outubro-Dezembro 2000.

AZEVEDO, W. M. *et al.* Allogeneic transplantation with blood stem-cells mobilized by rhg-csf for hematological malignancies. **Bone Marrow Transplantation**, v. 16, n. 5, p. 647-653, Nov 1995.

BENDORF, A.; KERRIDGE, I. H. Ethical issues in bone marrow transplantation in children. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 47, n. 9, p. 614-619, Sep 2011.

BENSINGER, W. I. *et al.* Peripheral-blood stem-cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte-colony-stimulating factor (RHG-CSF) - an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 87, n. 4, p. 825-831, Aug 1994.

_____. Transplantation of allogeneic peripheral-blood stem-cells mobilized by recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor. **Blood**, v. 85, n. 6, p. 1655-1658, Mar 15 1995.

BOURNAZOS, S. *et al.* Fc gamma Receptor IIIb (CD16b) Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Lung**, v. 188, n. 6, p. 475-481, Dec 2010.

_____. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 2, p. 244-254, Aug 2009.

BOUZAS, L. F. S. Bone marrow transplantation in children and cord blood transplantation. **Medicina (Ribeirao Preto)**, v. 33, n. 3, p. 241-263, Julho-Setembro 2000.

BRUIN, M. *et al.* Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course. **Vox Sanguinis**, v. 88, n. 1, p. 52-59, 2005.

BUX, J. Human neutrophil alloantigens. **Vox Sanguinis**, v. 94, n. 4, p. 277-285, 2008 2008.

BUX, J. *et al.* Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. **British Journal of Haematology**, v. 93, n. 3, p. 707-713, Jun 1996.

_____. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. **Transfusion Medicine**, v. 2, n. 2, p. 143-149, Jun 1992.

CARRERAS, E. Early complications after HSCT. In: APPERLEY, A. *et al* (Ed.). **Haematopoietic Stem Cell Transplantation: The EBMT Handbook**. 6th: ESH-EBMT, 2012. cap. 11, p.176-195.

CARUCCIO, L. *et al.* Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. **Transfusion**, v. 43, n. 3, p. 357-363, Mar 2003.

CHAMPLIN, R. E. *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3702-3709, Jun 15 2000.

CHU, H. T. *et al.* Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data. **Bmc Medical Genomics**, v. 6, p. 8, Sep 2013.

COPELAN, E. A. Conditioning regimens for allogeneic bone-marrow transplantation. **Blood Reviews**, v. 6, n. 4, p. 234-242, Dec 1992.

CORNETTA, K. *et al.* Umbilical Cord Blood Transplantation in adults: Results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, n. 2, p. 149-160, Feb 2005.

CURTIS, B. R. *et al.* The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an R > Q154 amino acid substitution. **Blood**, v. 115, n. 10, p. 2073-2076, Mar 11 2010.

DE HAAS, M. *et al.* Neutrophil antigen 5b is carried by a protein, migrating from 70 to 95 kDa, and may be involved in neonatal alloimmune neutropenia. **Transfusion**, v. 40, n. 2, p. 222-227, Feb 2000.

DEEG, H. J.; STORB, R. Graft-versus-host disease - pathophysiological and clinical aspects. **Annual Review of Medicine**, v. 35, p. 11-24, 1984 1984.

DEHAAS, M. *et al.* Neutrophil Fc-gamma-RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences - a study of 21 individuals from 14 families. **Blood**, v. 86, n. 6, p. 2403-2413, Sep 15 1995.

DEVETTEN, M.; ARMITAGE, J. O. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1450-1456, Sep 2007.

DHIR, S.; SLATTER, M.; SKINNER, R. Recent advances in the management of graft-versus-host disease. **Archives of Disease in Childhood**, v. 99, n. 12, p. 1150-1157, Dec 2014.

GLUCKSBE.H *et al.* Clinical manifestations of graft versus host disease in human recipients of marrow from hl-a-matched sibling donors. **Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 295-304, 1974 1974.

GOLDSCHMEDING, R. *et al.* Further characterization of the nb-1 antigen as a variably expressed 56-62 kd gpi-linked glycoprotein of plasma-membranes and specific granules of neutrophils. **British Journal of Haematology**, v. 81, n. 3, p. 336-345, Jul 1992.

GRATWOHL, A. *et al.* Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2374-2386, Oct 1 2002.

GRATWOHL, A.; CARRERAS, E. Principles of conditioning. In: APPERLEY, A. et al (Ed.). **Haematopoietic Stem Cell Transplantation: The EBMT Handbook**. 6th: ESH-EBMT, 2012. cap. 8, p.122-137.

GREINACHER, A. *et al.* Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 45-48, Jan 2010.

GREWAL, S. S. *et al.* Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4233-4244, Jun 1 2003.

HARRIS, E. S. *et al.* The leukocyte integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23409-23412, Aug 4 2000.

HUIZINGA, T. W. J. *et al.* Biallelic neutrophil NA-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc γ -receptor-III (CD16). **Blood**, v. 75, n. 1, p. 213-217, Jan 1 1990.

KERNAN, N. A. *et al.* Umbilical cord blood transplantation in pediatric patients: Results of the prospective, multi-institutional cord blood transplantation study (COBLT). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 2, p. 14-15, Feb 2006.

KISSEL, K. *et al.* Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4231-4233, Jun 1 2002.

KLINE, W. E. *et al.* 3-sera defining a new granulocyte-lymphocyte monocyte-lymphocyte lymphocyte-T antigen. **Vox Sanguinis**, v. 50, n. 3, p. 181-186, 1986 1986.

KOENE, H. R. *et al.* Fc γ RIIIB gene duplication: Evidence for presence and expression of three distinct Fc γ RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. **Blood**, v. 91, n. 2, p. 673-679, Jan 15 1998.

MILLER, J. *et al.* The human bone marrow as an immunoregulatory organ. **Transplantation**, v. 68, n. 8, p. 1079-1090, Oct 27 1999.

MORECKI, S. *et al.* Induction of Graft-versus-Leukemia (GVL) Effect without Graft-versus-Host Disease (GVHD) by Pretransplant Donor Treatment with Immunomodulators. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 4, p. 406-415, Apr 2009.

MORITZ, E. *et al.* Human neutrophil alloantigens systems. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 559-569, Sep 2009.

MULLIGHAN, C. G.; BARDY, P. G. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 13, n. 2, p. 127-144, Feb 2007.

MUSCHTER, S.; BERTHOLD, T.; GREINACHER, A. Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens. **Current Opinion in Hematology**, v. 18, n. 6, p. 452-460, Nov 2011.

OCHS, L. *et al.* Late infections after allogeneic bone-marrow transplantation - comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3979-3986, Nov 15 1995.

ORY, P. A. *et al.* Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor-III on human-neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 5, p. 1688-1691, Nov 1989.

_____. Transfected NA1 and NA2 forms of human neutrophil Fc receptor-III exhibit antigenic and structural heterogeneity. **Blood**, v. 77, n. 12, p. 2682-2687, Jun 15 1991.

PACZESNY, S. *et al.* New perspectives on the biology of acute GVHD. **Bone Marrow Transplantation**, v. 45, n. 1, p. 1-11, Jan 2010.

PARKMAN, R.; WEINBERG, K. I. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. **Immunological Reviews**, v. 157, p. 73-78, Jun 1997.

PATON, E. J. A.; COUTINHO, M. A.; VOLTARELLI, J. C. Diagnosis and treatment of acute complications of hematopoietic stem cell transplantation. **Medicina (Ribeirao Preto)**, v. 33, n. 3, p. 264-277, Julho-Setembro 2000.

PEREIRA, N. F. *et al.* Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 03-05, 2010-05 2010.

PETERS, C. *et al.* Statement of current majority practices in graft-versus-host disease prophylaxis and treatment in children. **Bone Marrow Transplantation**, v. 26, n. 4, p. 405-411, Aug 2000.

PRZEPIORKA, D. *et al.* Consensus conference on acute GVHD grading. **Bone Marrow Transplantation**, v. 15, n. 6, p. 825-828, Jun 1995.

RAAPHORST, F. M. Reconstitution of the B cell repertoire after bone marrow transplantation does not recapitulate human fetal development. **Bone Marrow Transplantation**, v. 24, n. 12, p. 1267-1272, Dec 1999.

RAVETCH, J. V.; PERUSSIA, B. Alternative membrane forms of Fc-gamma-RIII(CD16) on human natural-killer cells and neutrophils - cell type-specific expression of 2 genes that differ in single nucleotide substitutions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 2, p. 481-497, Aug 1 1989.

REIL, A. *et al.* Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 4, p. 313-317, Nov 2008.

_____. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fc gamma receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. **Transfusion**, v. 53, n. 10, p. 2145-2151, Oct 2013.

REIS, M. A. L.; VISENTAINER, J. E. L. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 3, p. 212-217, 2004 2004.

ROCHA, V. *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-Identical sibling. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 25, p. 1846-1854, Jun 22 2000.

RODRIGUES, C. A. *et al.* Transplante de sangue de cordão umbilical - SCU. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 08-12, 2010-05 2010.

SACHS, U. J. H. *et al.* Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond). **Transfusion Medicine**, v. 15, n. 2, p. 115-117, Apr 2005.

SANDERS, J. E. Bone marrow transplantation for pediatric malignancies. **Pediatric Clinics of North America**, v. 44, n. 4, p. 1005-&, Aug 1997.

SAVANI, B. N.; MOHTY, M. Bone Marrow Transplantation Preface. **Hematology-Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 6, p. XIII-XV, Dec 2014.

SEBER, A. O transplante de células-tronco hematopoéticas na infância: situação atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 59-67, 2009-05 2009.

SEBER, A.; CASTRO JR., C. G.; DAUDT, L. E. Transplante de medula óssea. In: (Ed.). **Hematologia para o pediatra**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007. cap. 37, p.506 p.

SILLIMAN, C. C. *et al.* Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1752-1755, Feb 15 2007.

SILVA, M. D. M.; BOUZAS, L. F. S.; FILGUEIRA, A. L. Manifestações tegumentares da doença enxerto contra hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 69-80, 2005-02 2005.

SIMSEK, S. *et al.* Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta(2) family recognized by human leukocyte alloantisera. **Blood**, v. 88, n. 4, p. 1350-1358, Aug 15 1996.

SPANGRUDE, G. J.; COOPER, D. D. Paradigm shifts in stem-cell biology. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 1, p. 3-10, Jan 2000.

STEFFENSEN, R. *et al.* Fc gamma RIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. **Transfusion**, v. 39, n. 6, p. 593-598, Jun 1999.

STRONCEK, D. F. *et al.* The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. **Transfusion Medicine**, v. 8, n. 2, p. 119-123, Jun 1998.

SUZUKI, H. I. *et al.* Antileukemic immunity associated with antineutrophil antibody production after allogeneic hematopoietic SCT for myeloid/NK-cell precursor acute leukemia. **Bone Marrow Transplantation**, v. 42, n. 4, p. 285-287, Aug 2008.

SYMONS, H. J.; FUCHS, E. J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. **Bone Marrow Transplantation**, v. 42, n. 6, p. 365-377, Sep 2008.

SZYDLO, R. *et al.* Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 1767-1777, May 1997.

TORRES, M. *et al.* Seleção de doador não aparentado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 06-07, 2010-05 2010.

TROUNSTINE, M. L. *et al.* Reactivity of cloned, expressed human Fc-gamma-RIII isoforms with monoclonal-antibodies which distinguish cell-type-specific and allelic forms of Fc-gamma-RIII. **International Immunology**, v. 2, n. 4, p. 303-310, Apr 1990.

VELDHUISEN, B. *et al.* Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). **Transfus Apher Sci**, v. 50, n. 2, p. 189-99, Apr 2014.

VOLTARELLI, J. C.; STRACIERI, A. B. P. L. Immunological aspects of hematopoietic stem cell transplantation. **Medicina (Ribeirao Preto)**, v. 33, n. 4, p. 443-462, Outubro-Dezembro 2000.

WITHERSPOON, R. P. *et al.* Regulation of immunoglobulin production after human marrow grafting - the role of helper and suppressor T-cells in acute graft-versus-host disease. **Transplantation**, v. 41, n. 3, p. 328-335, Mar 1986.

XIA, W. *et al.* The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou. **Transfusion**, v. 51, n. 6, p. 1271-1277, Jun 2011.

7 ARTIGO

FREQUÊNCIA DOS ANTIGENOS E ANTICORPOS NEUTROFÍLICOS HUMANOS (HNA) EM DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULA TRONCO HEMATOPOIÉTICA (TCTH) E SUA CORRELAÇÃO COM DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA

Fabiana de Souza Pereira^{1,4}, Jorge Neumann⁴, Alessandra Aparecida Paz³, Liselena Carvalho³, Heloísa Tarasconi⁴, Lisandra Rigoni³, Lúcia Mariano da Rocha Silla², Liane Esteves Daudt¹

1. Programa de Pós-graduação da Saúde da Criança e Adolescente, UFRGS
2. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, UFRGS
3. Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre

RESUMO

Background e objetivo. A reconstituição celular hematopoiética com medula óssea alogênica é um método de tratamento estabelecido para uma variedade de doenças hematológicas, oncológicas e imunológicas. Contudo, o TCTH está associado a considerável morbimortalidade devido a fatores como recidiva da doença de base, grau de compatibilidade HLA e tipo de regime de condicionamento. Este estudo investigou a frequência genotípica e antigênica do HNA em doadores e receptores e a associação com o dia de pega, DECH aguda e TRM em pacientes que foram submetidos a TCTH alogênico.

Tipo de estudo e local. Estudo piloto de coorte prospectivo realizado no HCPA.

Métodos. Participaram 56 pacientes e doadores entre maio de 2013 e abril de 2014. A tipagem HNA foi realizada por PCR-SSP (One Lambda) e os anticorpos anti-HNA foram detectados utilizando o kit LABSCREEN MULTI (LSMUTR – One Lambda).

Resultados. A idade variou entre 1 a 63 anos, com uma média de $20,4 \pm 17,5$ anos. Dezenove pacientes eram pediátricos (<21 anos) com média de idade de $10,05 \pm 6,4$ anos e entre os pacientes adultos a média foi $42,2 \pm 12,6$ anos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino 16 (57,1%). As leucemias agudas foram frequentes em 19 (67,9%) dos pacientes, outras doenças oncohematológicas malignas em 3 (10,7%) e as não malignas em 6 (21,4%) dos casos. Dezenove pacientes (67,9%), apresentavam a doença há menos de 12 meses na época do transplante e 25 (89,3%) deles foram totalmente compatíveis com seus doadores quanto ao sistema HLA. O regime de condicionamento mieloablativo foi utilizado em 16 (57,1%) e a profilaxia padrão para DECH (ciclosporina e metotrexate) foi utilizada em 15 (53,6%). O dia de pega teve uma mediana de 19 com mínimo e máximo de 15 e 30, respectivamente. Houveram quatro óbitos (14,3%) antes da pega. Dezesete pacientes (71%) apresentaram DECH aguda (em todos os estágios) e a taxa de mortalidade (TRM) foi 43% dos casos (12 pacientes). A frequência dos antígenos HNA foi 46,4% para HNA-1a, 89,3% HNA-1b, 3,6% HNA-1c, 96,4% HNA-3a, 32,1% HNA-3b, 96,4% HNA-4a, 21,4% HNA-4b, 85,7% HNA-5a e 71,4% HNA-5b. A frequência dos anticorpos anti-HNA1a, 1b, 1c e anti-HNA2 no D0 foram respectivamente 46,4%, 42,9%, 42,9% e 53,6%. A associação entre a tipagem HNA dos doadores e anticorpos anti-HNA dos receptores com dia da pega, TRM e DECH aguda não mostrou correlação estatisticamente significativa.

Conclusões. A frequência de HNA encontrada nos doadores está de acordo com o descrito pela literatura. Contudo, a frequência dos anticorpos anti-HNAs foi bastante alta na população do estudo, embora a maioria apresentasse doença há menos de 12 meses até o transplante. Apesar

de não encontrarmos uma correlação, novos estudos são necessários para melhor avaliar o papel do HNA no desfecho do TCTH.

Palavras chave. Transplante de células tronco hematopoiéticas; Doença do enxerto contra hospedeiro aguda; Aloantígeno neutrofílico humano.

INTRODUÇÃO

A seleção do doador com grau adequado de compatibilidade representa uma das estratégias essenciais para o sucesso do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Dentre os fatores genético que exercem maior influência no resultado destes transplantes estão os genes do sistema HLA, caracterizados por extenso polimorfismo (PEREIRA *et al.*, 2010).

De todas as fontes de células potenciais para o TCTH alogênico, o doador HLA aparentado totalmente compatível continua contribuindo para as melhores taxas de sobrevida global e livre de progressão da doença (SYMONS e FUCHS, 2008; SABOYA *et al.*, 2010). Infelizmente, apenas 25% - 30% dos candidatos a TCTH alogênico apresentam um doador aparentado HLA compatível (SZYDLO *et al.*, 1997; SABOYA *et al.*, 2010).

Todos os pacientes que receberam células progenitoras hematopoiéticas alogênicas provenientes da medula óssea, de sangue periférico ou do sangue de cordão umbilical e placentário estão sujeitos a desenvolver a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (HALE *et al.*, 2001). A DECH aguda permanece sendo uma fonte significativa de morbidade e mortalidade no desfecho do TCTH alogênico (MESSINA *et al.*, 2008).

Os aloantígenos neutrofílicos humano (HNA) exercem um importante papel provocando neutropenia imune e reações transfusionais. Aloanticorpos específicos contra HNAs têm sido descritos como causa de distúrbios clínicos como neutropenia aloimune neonatal, reações

transfusionais febris, lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI) e neutropenia imune após TCTH (NORCIA *et al.*, 2009).

Onze antígenos foram descritos até agora, HNA-1 a HNA-5 (VELDHUISEN *et al.*, 2014). Entretanto dados de suas frequências e impacto no resultado do TMO são pouco descritos na literatura.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a frequência, genotípica e antigênica, na nossa população e investigar a associação dos HNAs do doador e anti-HNAs do receptor com tempo de enxertia, a ocorrência de DECH aguda e TRM após TCTH alogênico.

METODOLOGIA

População

Estudo piloto de coorte prospectivo onde foram avaliados pacientes submetidos ao TCTH alogênico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de maio de 2013 a abril de 2014 e que aceitaram assinar o TCLE de forma contínua.

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 130199.

Variáveis

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes: idade, sexo, doença de base, tipo de condicionamento, tipo de profilaxia para DECH, compatibilidade HLA doador/receptor, dia de pega, tipagem HNA do doador, presença de anticorpo anti-HNA do receptor nos dias D0,

D+15, D+30, D+60 e D+90, presença de DECH aguda, taxa de mortalidade no D+100 e quimerismo.

Processamento das amostras

Extração de DNA

Amostras de sangue periférico dos doadores foram coletadas através de punção venosa, em tubos vacutainer contendo EDTA como anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, a partir da qual o DNA foi extraído usando o kit Maxwell 16 Blood DNA Purification System (Promega) seguindo as orientações do fabricante.

Tipagem HNA dos doadores por PCR - SSP

A tipagem HNA foi realizada pelo método PCR – SSP utilizando o kit HNA GenotypingTray (HNAGEN – One Lambda). Este kit permite a identificação dos genótipos HNA-1, HNA-3, HNA-4 e HNA-5.

Para amplificação do DNA, preparou-se uma mistura padrão contendo tampão, dNTPs, Taq polimerase, DNA genômico (20 – 100ng/μL) e adicionou-se no termociclador.

As condições de temperatura para a reação de PCR foram de 2 minutos de desnaturação a 96°C, e de mais 60s a 63°C. Após, 9 ciclos de 10s a 96°C e de 60s a 63°C. Seguidos de 20 ciclos de 10s a 96°C, 50s a 59°C e 30s a 72°C.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2,5% (p/v) em tampão tris acetato EDTA (TAE). A corrida eletroforética durou 4 minutos à 140V, em

temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas em luz UV através da coloração do brometo de etídeo.

Amostras dos pacientes

Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas através de punção venosa, em tubos vacutainer sem anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas e o soro foi aliquoteado em flaconetes a partir do qual foi realizado o teste de detecção de anticorpos.

Detecção de anticorpos anti- HNA dos pacientes

Os anticorpos anti - HNA foram detectados usando o kit LABSCREEN MULTI (LSMUTR – One Lambda). Foram detectados anti-HNA-1 e anti-HNA-2.

A incubação do soro dos pacientes com as “beads” contidas no kit e todos os passos seguintes foram realizados de acordo com as instruções da bula do kit. Os anticorpos do soro que se ligaram às “beads” foram marcados com conjugado PE – antiIgG humana que permite a leitura no aparelho Luminex. A análise dos resultados foi feita no software HLA FusionLABScreen, o qual fez a coleta dos dados e a determinação dos anticorpos presentes.

Análise estatística

Para estabelecer as associações assumimos TRM como sendo a mortalidade relacionada ao transplante (não por recaída da doença de base) até o D+100 pós-TMO. DECH aguda caracterizando a doença do enxerto contra hospedeiro (em todos os estágios) que ocorre dentro de 100 dias após o TMO. E pega quando as contagens de leucócitos mantêm-se acima de 500 células/mm³ por três dias consecutivos.

Os dados foram analisados usando a versão 18 do software SPSS. As frequências foram comparadas utilizando teste exato de Fisher. Foi utilizado Mann-Whitney para realizar comparações entre os grupos de variável dependente não paramétrica e Kruskal-Wallis para comparar as variáveis independentes não paramétricas.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 28 pares doador/receptor coletados entre maio de 2013 e abril de 2014, sendo 17 aparentados entre eles, um singênico, um com *mismatch* no locus A, um com *mismatch* no locus DR e um haploidêntico. Os 11 doadores não aparentados foram totalmente compatíveis por tipagem de alta resolução 10/10. Todos estes pacientes e seus doadores foram considerados para análise, exceto o paciente do transplante singênico que não foi possível realizar a detecção de anticorpos por falta de kit e que foi excluído de todas as análises. A idade variou entre 1 a 63 anos, com mediana de 16 anos. Dezenove pacientes eram pediátricos (< 21 anos) com média de idade de $10,05 \pm 6,4$ anos e entre os pacientes adultos a média foi $42,2 \pm 12,6$ anos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino 16 (59,3%). Vinte e quatro pacientes (88,9%) foram totalmente compatíveis com seus doadores quanto ao sistema HLA.

As leucemias agudas foram frequentes em 73,7% dos pacientes pediátricos (14 pacientes), 1 paciente pediátrico (5,3%) apresentou outras doenças oncohematológicas malignas (Linfoma Hodgkin e Linfoma não Hodgkin) e as doenças não malignas (síndrome mielodisplásica, osteopetrose, hemoglobinúria paroxística noturna, aplasia e doença granulomatosa) estiveram em 4 (21,1%) dos casos pediátricos.

A maioria dos pacientes, 19 (70,4%), apresentava a doença há menos de 12 meses na época do transplante.

O regime de condicionamento mieloablativo foi utilizado em 16 (59,3%) dos pacientes e a fonte de células tronco foi medula óssea para 23 (85,2%) e sangue periférico para 4 (14,9%) dos pacientes. A profilaxia padrão para DECH (ciclosporina e metotrexate) foi utilizada em 15 (55,6%) dos pacientes. O quimerismo estava completo em 18 (90%) dos 20 pacientes avaliados no D+30, em 12/12 (100%) no D+60 e em 11/14 (78,6%) no D+90.

O dia de pega teve uma mediana de 19 e mínimo e máximo de 15 e 30, respectivamente. Quatro pacientes (14,8%) tiveram óbito antes da pega, todos por sepse.

Aproximadamente, 71% (17 pacientes), apresentaram DECH aguda, foram excluídos desta análise os quatro pacientes com óbito antes da pega. A taxa de mortalidade (TRM) foi de aproximadamente 44,4% dos casos (12 pacientes) durante o período do estudo. Os pacientes que receberam TCTH de um doador aparentado tiveram TRM de aproximadamente 41% (7 pacientes) e os que receberam de um doador não aparentado foi de aproximadamente 45% (5 pacientes).

A frequência dos antígenos HNA detectados nos doadores é ilustrada no **gráfico 1** e o achado é próximo ao descrito pela literatura. (BUX, 2008; MORITZ et al., 2009).

A análise da associação entre todos os genótipos HNA dos doadores com dia da pega, DECH aguda e TRM não mostrou nenhum resultado estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

As variações dos anticorpos anti-HNA1a, anti-HNA1b, anti-HNA1c e anti-HNA2, nos diferentes momentos de coleta, são apresentadas no **gráfico 2**.

Gráfico 1: frequência dos HNAs nos doadores

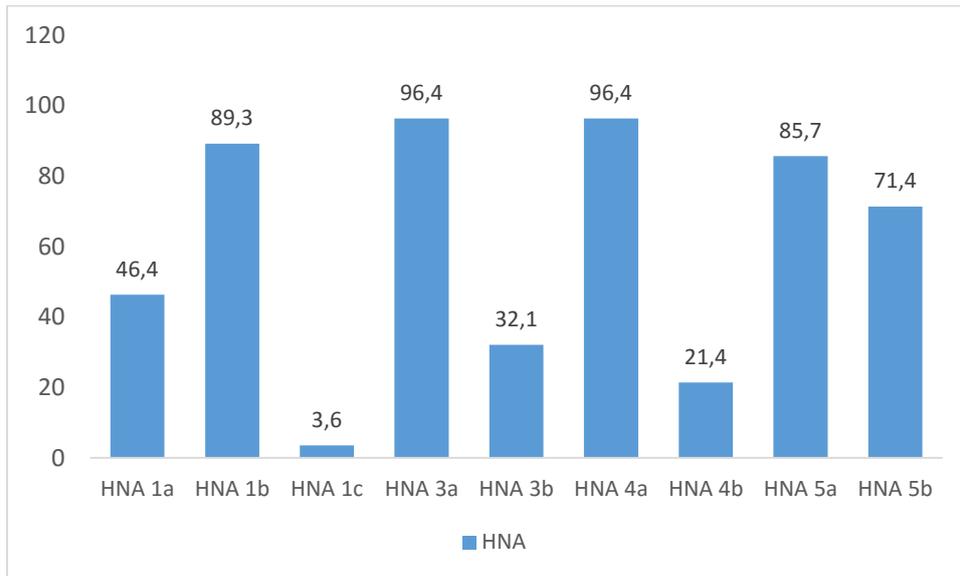
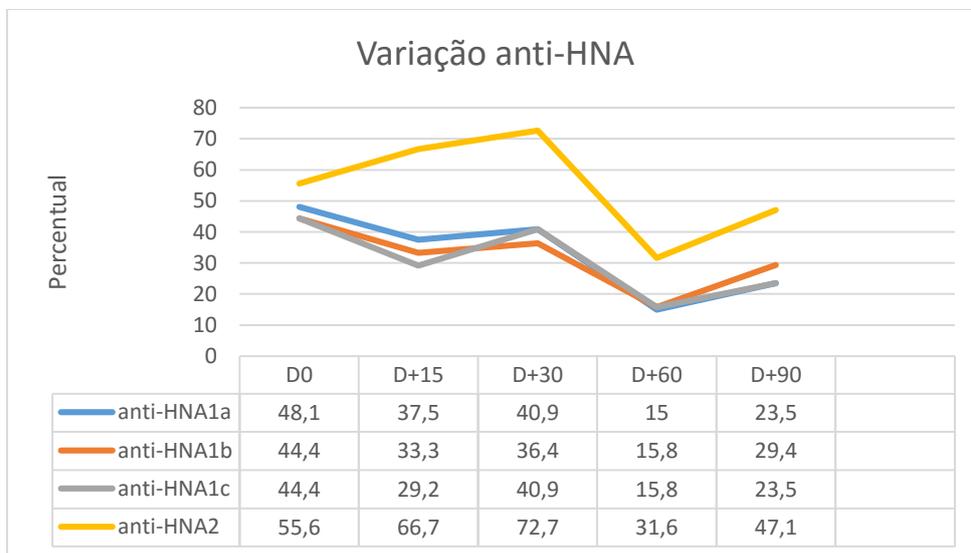


Gráfico 2: variação dos anticorpos anti-HNA



A frequência dos anticorpos anti-HNA no D0 foi de 48,1% para anti-HNA1a, 44,4% para anti-HNA1b e anti-HNA1c e de 55,6% para anti-HNA2. Os pacientes pediátricos apresentaram em D0 47,4% de anti-HNA1a, anti-HNA1b e anti-HNA1c e 63,2% de anti-HNA2

enquanto nos pacientes adultos a frequência em D0 foi de 50% de anti-HNA1a e de 37,5% de anti-HNA1b, anti-HNA1c e anti-HNA2.

Entre as doenças de base as leucemias apresentaram em D0 42,1% de anti-HNA1a, anti-HNA1b e anti-HNA1c e 47,4% de anti-HNA2. Entre outras doenças oncohemato malignas a frequência foi de 33,3% para anti-HNA1a, 100% para anti-HNA1b e anti-HNA1c e 66,7% para anti-HNA2. E, entre as doenças não malignas, 80% dos pacientes apresentaram anti-HNA1a, anti-HNA1b, anti-HNA1c e anti-HNA2.

Por não haver correlação clínica significativa optamos por apresentar os resultados somente do momento D0 (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência dos anticorpos anti-HNA em D0 e suas associações com DECH aguda, TRM e dia da pega

		anti-HNA D0										Valor P*
		Todos negativos					Algum positivo					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH AGUDA	NEG	3	33,3				7	38,9				1,000
	POS	6	66,7				11	61,1				
TRM	VIVO	7	77,8				8	44,4				0,217
	ÓBITO	2	22,2				10	55,6				
DIA DA PEGA		8		19	18,25	21,50	15		20	17	22	0,925

P*: teste exato de Fisher

P***: teste de Mann-Whitney

DISCUSSÃO

A frequência com que os anticorpos e antígenos HNA estão implicados no TCTH e seu papel no desfecho deste procedimento não estão bem definidos.

Anticorpos contra HNAs estão envolvidos com a patofisiologia de várias condições clínicas, portanto a identificação de antígenos e anticorpos neutrofílicos em diferentes populações é importante para melhor prever o risco de aloimunização (LOPES *et al.*, 2014). Neste estudo investigamos a frequência dos antígenos e anticorpos HNAs em doadores e receptores de CTH usando PCR-SSP e citometria de fluxo com analisador Luminex, respectivamente.

A frequência do genótipo HNA-1a (46,4%) foi a única um pouco menor do que a descrita (NORCIA *et al.*, 2009). Já a frequência do genótipo HNA-1b (89,3%), HNA-1c (3,6%), HNA-3a (96,4%), HNA-3b (32,1%), HNA-4a (96,4%), HNA-4b (21,4%), HNA-5a (85,7%) e HNA-5b (71,4%) foram bastante similar às aquelas relatadas na literatura (BUX, 2008; MORITZ *et al.*, 2009; NORCIA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2014).

A frequência dos anticorpos anti-HNA-1a, anti-HNA-1b, anti-HNA-1c e anti-HNA-2 foi de 48,1%, 44,4%, 44,4% e 55,6%, respectivamente. Não existem dados mostrando a frequência dos anti-HNAs em uma população de pacientes submetidos ao TCTH.

Uma justificativa para a variação dos anticorpos anti-HNA nos cinco momentos de coleta pode estar relacionada ao *cut-off* do teste, amostras que tiveram resultados limítrofes podem, por imprecisão, estar marginalmente em um lado ou do outro do *cut-off* ao longo do seguimento. Além disso, precisamos levar em conta que a sensibilidade às doses das drogas imunossupressoras é variável e doses inferiores às necessárias podem justificar o aparecimento de anticorpos. É necessário considerar também a aderência ao tratamento, “non compliance” é muito comum, especialmente entre jovens.

Dois pacientes apresentaram sintomas de TRALI (até 6h após a infusão), com desconforto respiratório e congestão, necessitando de utilização de O₂. O primeiro paciente teve boa evolução com corticóide. Porém, o segundo paciente teve óbito em menos de 48h.

A TRALI está associada com a transfusão passiva de anticorpos de leucócitos em produtos derivados de sangue (LUCAS *et al.*, 2012). Por não possuímos dados, não podemos avaliar a presença de anticorpos anti-HNA nos doadores destes pacientes e estabelecer uma possível associação com o quadro desenvolvido.

Anticorpos para HNA-3a são de especial importância, uma vez que eles são frequentemente implicados em casos graves ou fatais de TRALI (DAVOREN *et al.*, 2003; REIL *et al.*, 2008; BUX, 2011). Anticorpos para HNA-2, HNA-1a e HNA-1b também têm sido associados com este quadro (REIL *et al.*, 2008; CHAPMAN *et al.*, 2009; BUX, 2011).

A maioria dos pacientes eram jovens, apresentavam a doença há menos de 12 meses na época do transplante e tiveram como doença de base as leucemias agudas, isso reflete a maior frequência dos regimes de condicionamento mieloablativos empregados. Estes condicionamentos são projetados para produzir extensa destruição da hematopoese do receptor, assim como profunda imunossupressão. São os regimes mais adequados ao tratamento de neoplasias hematológicas, onde um clone precisa ser erradicado e controlado a longo prazo para promover a cura (SANDERS, 1997).

A TRM apresentada neste estudo mostrou-se acima dos dados descritos na literatura. No Brasil, a mortalidade relacionada ao transplante aparentado é de 20% e aos não aparentados de 39%, associada principalmente a infecções, recidiva, falha de pega e DECH (SEBER, 2009). Nossos dados mostraram uma TRM de aproximadamente 41% e 45% para TCTH aparentado e não aparentado, respectivamente. Porém, é importante relatar que houveram 22 óbitos por sepse em pacientes submetidos ao TCTH na instituição nos anos de 2013/2014. Entre eles, seis participavam deste estudo, o que representa, aproximadamente, 22% dos pacientes estudados.

Dos três pacientes (11,1%) que apresentavam incompatibilidade HLA, dois foram a óbito. Um deles apresentava mismatch no locus A e o outro no locus DRB1. Um estudo do

NMDP demonstrou uma queda de cerca de 10% na sobrevida pós transplante a cada incompatibilidade HLA adicional (MORISHIMA *et al.*, 2002; PETERSDORF *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2010). Em 1995, a incompatibilidade em DRB1 foi associada com maior risco de DECH aguda e de mortalidade (PEREIRA *et al.*, 2010).

Concluimos que a frequência do genótipo HNA visto na população de pacientes submetidos ao TCTH durante o estudo é comparável com a relatada por Norcia *et al.*, 2009. Nossos achados não sugerem associação significativa entre antígeno HNA dos doadores e anticorpos anti-HNA presentes nos receptores com dia de pega, DECH aguda e TRM em pacientes submetidos ao TCTH alogênico. Mas acreditamos ser necessário a continuação deste estudo para que um número maior de pacientes possa ser avaliado e para que se possa ter dados com maior poder estatístico.

REFERÊNCIAS

BUX, J. Human neutrophil alloantigens. **Vox Sanguinis**, v. 94, n. 4, p. 277-285, 2008 2008.

BUX, J. Antibody-mediated (immune) transfusion-related acute lung injury. **Vox Sanguinis**, v. 100, n. 1, p. 122-128, Jan 2011.

CHAPMAN, C. E. *et al.* Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. **Transfusion**, v. 49, n. 3, p. 440-452, Mar 2009.

DAVOREN, A. *et al.* TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. **Transfusion**, v. 43, n. 5, p. 641-645, May 2003.

GRATWOHL, A.; CARRERAS, E. Principles of conditioning. In: APPERLEY, A.; CARRERAS, E., *et al.* (Ed.). **Haematopoietic Stem Cell Transplantation: The EBMT Handbook**. 6th: ESH-EBMT, 2012. cap. 8, p.122-137.

HALE, G. A. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation in children failing prior autologous bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 27, n. 2, p. 155-162, Jan 2001.

LEE, S. J. *et al.* High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4576-4583, Dec 15 2007.

LOPES, L. B. *et al.* HNA-3 gene frequencies in Brazilians and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-3a/3b genotyping. **Transfusion**, v. 54, n. 6, p. 1619-1621, Jun 2014.

LUCAS, G. *et al.* Reducing the incidence of TRALI in the UK: the results of screening for donor leucocyte antibodies and the development of national guidelines. **Vox Sanguinis**, v. 103, p. 10-17, 2012.

MATTHES-MARTIN, S. *et al.* Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. **Leukemia**, v. 17, n. 10, p. 1934-1942, Oct 2003.

MESSINA, C. *et al.* Prevention and treatment of acute GvHD. **Bone Marrow Transplantation**, v. 41, p. S65-S70, Jun 2008.

MORISHIMA, Y. *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**, v. 99, n. 11, p. 4200-4206, Jun 1 2002.

MORITZ, E. *et al.* Human neutrophil alloantigen systems. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 559-569, Sep 2009.

NORCIA, A. M. M. I. *et al.* Human neutrophil alloantigen-1a,-1b,-2,-3a and-4a frequencies in Brazilians. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 5, p. 404-407, Nov 2009.

PEREIRA, N. F. *et al.* Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 03-05, 2010-05 2010.

PETERSDORF, E. W. *et al.* Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2976-2980, Nov 1 2004.

REIL, A. *et al.* Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 4, p. 313-317, Nov 2008.

SABOYA, R. *et al.* Transplante de medula óssea com doador familiar parcialmente compatível. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 13-15, 2010-05 2010.

SEBER, A. O transplante de células-tronco hematopoéticas na infância: situação atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 59-67, 2009-05 2009.

SYMONS, H. J.; Fuchs, E. J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. **Bone Marrow Transplantation**, v. 42, n. 6, p. 365-377, Sep 2008.

SZYDLO, R. *et al.* Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 1767-1777, May 1997.

VELDHUISEN, B. *et al.* Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). **Transfusion and Apheresis Science**, v. 50, n. 2, p. 189-199, Apr 2014.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há muito tempo pesquisadores voltam seus interesses para o sistema HNA. Estudos têm demonstrado um papel importante deste sistema em várias condições clínicas, incluindo neutropenias auto e aloimunes, reações transfusionais e, parece estar melhor descrito, nos casos de TRALI.

Dentre as morbidades pós TCTH alogênico está o aparecimento, ainda bastante significativo de DECH aguda, o que faz com que essa patologia ainda seja um limitante na indicação desta terapia, e também aumenta a probabilidade de complicações e prolonga o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade. O emprego de novas ferramentas de compatibilidade entre doador e receptor podem ajudar a diminuir o risco desta doença.

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência do genótipo HNA dos doadores e dos anticorpos anti-HNA dos receptores e suas associações em DECH aguda, TRM e dia de pega, com a finalidade de incentivar novos estudos sobre a relação do sistema HNA em pacientes submetidos ao TCTH. Avaliamos 28 pares doador/receptor e não observamos nenhum dado estatisticamente significativo. Contudo outros estudos devem ser desenvolvidos com a finalidade conseguir avaliar um número mais significativo de pacientes e assim chegar a resultados com maior força estatística.

ANEXOS

Anexo I – Protocolo de coleta de dados

Projeto: Frequência dos antígenos neutrofílicos humanos (HNA) em doadores e receptores de transplante alogênico de célula tronco hematopoiética (TCTH) e sua correlação com doença enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda

Nome do paciente:

Idade do paciente:

Número paciente:

Nome responsável:

Doença de base:

Data coleta D0:

Prontuário:

Fone:

Nome doador:

Idade doador:

Número doador:

Nome responsável:

Parentesco:

Data coleta:

Fone:

Doação: Medula óssea Sangue periférico

Data transplante:

Data da pega:

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pacientes e Doadores

Projeto: “**Frequência dos antígenos neutrofilicos humanos (HNA) em doadores e receptores de transplante alogênico de célula tronco hematopoiética (TCTH) e sua correlação com doença enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda**”

Informações sobre a pesquisa e objetivo:

A doença enxerto-contrahospedeiro (DECH) é uma importante causa da falha do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico. Este estudo está sendo realizado com o objetivo de identificar um dos fatores de risco da DECH e com isso reduzir a incidência e gravidade da doença.

Funcionamento da pesquisa: No pré TCTH será feito uma coleta de dois tubos de sangue (5mL cada) do doador e receptor e a amostra será encaminhada ao laboratório de Imunologia de Transplante da Santa Casa de Porto Alegre. Do paciente (receptor) serão feitas coletas de um tubo de sangue (5mL) nos dias 15, 30, 60 e 90 pós TCTH e a amostra também será enviada para o laboratório acima. Os participantes podem aceitar, assim como se recusar a participar do estudo. Também podem descontinuar a pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou penalidade do seu atendimento na instituição. Os participantes não recebem qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Todas as informações sobre a pesquisa estarão disponíveis e todas as dúvidas sobre direitos enquanto participante da pesquisa poderão ser esclarecidas com a pesquisadora:

Fabiana de Souza Pereira (pesquisadora executora) – 96121017

Ou através do contato com o Comitês de Ética em Pesquisa:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 33597640

Santa Casa de Porto Alegre: 32148571

Todos os participantes que assinarem este Termo de Consentimento ficarão com uma via deste documento.

Confidencialidade: o nome do participante não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois será identificado com um número.

Risco e desconfortos: o único desconforto é a coleta de sangue que pode deixar uma mancha arroxeadada no local.

Benefícios: o paciente não terá benefícios diretos em participar deste estudo mas irá colaborar para o avanço e progresso na seleção de doadores de medula óssea.

Compreensão e Autorização

Eu, _____ pelo presente termo de compromisso compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. O termo que li, esclarece os risco e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e isso não afetará meu atendimento e tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu CONCORDO em fazer parte do estudo voluntariamente.

Nome legível participante

_____ Data: _____

Assinatura participante

Nome legível responsável

_____ Data: _____

Assinatura responsável

Nome pesquisador

_____ Data: _____

Assinatura pesquisador

ANEXO III: Informação suplementar

Tabela 6: Frequência dos antígenos HNA dos doadores suas associações com dia de pega, DECH aguda e TRM

		HNA 1a										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	7	46,7				4	30,8				Valor P*
AGUDA	POS	8	53,3				9	69,2				0,460
	VIVO	7	46,7				9	69,2				Valor P*
TRM	ÓBITO	8	53,3				4	30,8				0,276
DIA DA												Valor P**
PEGA		13		21	16,5	24,5	11		19	17	20	0,392

P*: teste exato de Fisher

P***: teste de Mann-Whitney

		HNA 1b										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	0	0,0				11	44,0				Valor P*
AGUDA	POS	3	100,0				14	56,0				0,258
	VIVO	2	66,7				14	56,0				Valor P*
TRM	ÓBITO	1	33,3				11	44,0				1,000
DIA DA												Valor P**
PEGA		2		17,5	17		22		19,5	17,75	22	0,261

P*: teste exato de Fisher

P***: teste de Mann-Whitney

		HNA 1c									
		NEGATIVO					POSITIVO				
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75
DECH	NEG	11	40,7				0	0,0			Valor P*
AGUDA	POS	16	59,3				1	100,0			1,000
TRM	VIVO	16	59,3				0	0,0			Valor P*
	ÓBITO	11	40,7				1	100,0			0,429
DIA DA PEGA		24		19	17,25	21,75	0				-

P*: teste exato de Fisher

P***: teste de Mann-Whitney

		HNA 3a										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	0	0,0				11	40,7			Valor P*	
AGUDA	POS	1	100,0				16	59,3			1,000	
TRM	VIVO	0	0,0				16	59,3			Valor P*	
	ÓBITO	1	100,0				11	40,7			0,429	
DIA DA PEGA		1		22	22	22	23		19	17	21	Valor P**
											0,417	

P*: teste exato de Fisher

P***: teste de Mann-Whitney

		HNA 3b										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	8	42,1				3	33,3				Valor P*
AGUDA	POS	11	57,9				6	66,7				1,000
TRM	VIVO	12	63,2				4	44,4				Valor P*
	ÓBITO	7	36,8				5	55,6				0,432
DIA DA PEGA		17		20	17,5	21,5	7		18	17	22	Valor P** 0,494

P*: teste exato de Fisher

P**: teste de Mann-Whitney

		HNA 4a										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	1	100,0				10	37,0				Valor P*
AGUDA	POS	0	0,0				17	63,0				0,393
TRM	VIVO	1	100,0				15	55,6				Valor P*
	ÓBITO	0	0,0				12	44,4				1,000
DIA DA PEGA		1		15	15	15	23		19	18	22	Valor P** 0,167

P*: teste exato de Fisher

P**: teste de Mann-Whitney

		HNA 4b										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	8	36,4				3	50,0				Valor P*
AGUDA	POS	14	63,6				3	50,0				0,653
TRM	VIVO	13	59,1				3	50,0				Valor P*
	ÓBITO	9	40,9				3	50,0				1,000
DIA DA PEGA		19		19	17	22	5		20	16,5	25	Valor P** 0,891

P*: teste exato de Fisher

P**: teste de Mann-Whitney

		HNA 5a										
		NEGATIVO					POSITIVO					
		N	%	Mediana	P25	P75	N	%	Mediana	P25	P75	
DECH	NEG	1	25,0				10	41,7				Valor P*
AGUDA	POS	3	75,0				14	58,3				1,000
TRM	VIVO	3	75,0				13	54,2				Valor P*
	ÓBITO	1	25,0				11	45,8				0,613
DIA DA PEGA		3		19	19		21		19	17	22	Valor P** 1,000

P*: teste exato de Fisher

P**: teste de Mann-Whitney