



DANIELA MAIRA CARDOZO

IMPORTÂNCIA DAS DISPARIDADES GENÉTICAS NOS
GENES HLA E KIR NA RESPOSTA DE PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS PARA O
TRATAMENTO DE DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS

*IMPORTANCE OF GENETIC DIFFERENCES IN HLA AND
KIR GENES IN THE RESPONSE OF PATIENTS
UNDERGOING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM
CELL TRANSPLANTATION FOR TREATMENT OF ONCO-
HEMATOLOGICAL DISEASES*

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

DANIELA MAIRA CARDOZO

IMPORTÂNCIA DAS DISPARIDADES GENÉTICAS NOS GENES HLA E KIR NA
RESPOSTA DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO
DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS PARA O TRATAMENTO
DE DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS

Orientador (a) / Supervisor: Prof. Dr. Carmino Antonio de Souza

Co-Orientador/Co-Supervisor: Profa. Dra. Jeane Eliete L. Visentainer

*IMPORTANCE OF GENETIC DIFFERENCES IN HLA AND KIR GENES IN THE
RESPONSE OF PATIENTS UNDERGOING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC
STEM CELL TRANSPLANTATION FOR TREATMENT OF ONCO-
HEMATOLOGICAL DISEASES*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

*Doctoral Thesis presented to the Internal Medicine
Postgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State
University of Campinas, for obtainment of the Ph.D. degree in Internal
Medicine, specialization in Internal Medicine.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
DANIELA MAIRA CARDOZO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C179i Cardozo, Daniela Maira, 1984-
Importância das disparidades genéticas nos genes HLA e KIR na resposta de pacientes submetidos ao transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas para o tratamento de doenças onco-hematológicas / Daniela Maira Cardozo. --Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Cármino Antonio de Souza.
Coorientador : Jeane Eliete Laguila
Visentainer.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Complexo principal de histocompatibilidade. 2. Receptores KIR. 3. Células matadoras naturais. 4. Células-tronco hematopoéticas. 5. Doença enxerto-hospedeiro. I. Souza, Carmino Antonio de, 1951-. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Importance of genetic differences in HLA and KIR genes in the response of patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for treatment of onco-hematological diseases.

Palavras-chave em inglês:

Major histocompatibility complex Receptors, KIR Killer cells, Natural Hematopoietic stem cells
Graft vs host disease

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Cármino Antonio de Souza [Orientador]

Margareth Castro Ozelo

Fabiola Traina

Ana Maria Sell

Eduardo Magalhães Rego

Data da defesa: 22-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

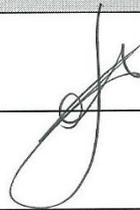
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANIELA MAIRA CARDOZO

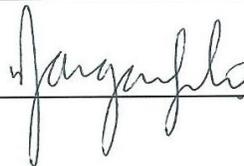
Orientador PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA

MEMBROS:

1. PROF. DR. CÁRMINO ANTONIO DE SOUZA



2. PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO



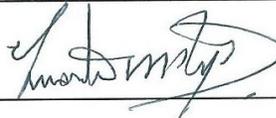
3. PROFA. DRA. FABIOLA TRAINA



4. PROFA. DRA. ANA MARIA SELL



5. PROF. DR. EDUARDO MAGALHÃES REGO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de fevereiro de 2013

À Deus que permitiu que todo esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu orientador, Prof^o Cármino Antonio de Souza, pela orientação e por ter acreditado e apoiado esse projeto.

Aos membros desta banca, titulares e suplentes, pelo tempo dedicado, para a leitura e discussão deste projeto.

Ao Dr. Fernando Guimarães e à equipe do CAISM cuja ajuda, companheirismo e orientação foram fundamentais para que esse trabalho fosse possível.

Ao Dr. Aranha e a toda a equipe do TMO pela orientação, acessibilidade aos pacientes, amizade e dedicação ao projeto, que tornaram possível a execução de todo o trabalho.

À minha co-orientadora Profa Dra Jeane Visentainer pela dedicação ao nosso projeto e cuja orientação e apoio foram essenciais para que o este projeto de doutorado fosse concluído.

À toda a equipe da pesquisa clínica, Maria Helena, Thaísa e Soraya pela paciência, companheirismo e cooperação.

À toda a minha família que sempre me incentivou, acreditou no meu trabalho e me deu forças para ir até o fim.

Ao meu marido Doug que sempre me apoiou, nunca deixou de me incentivar e sempre tentou compreender como funciona as “escadinhas” da molécula de DNA.

Aos meus amigos Amanda, Gláucia, Rodrigo e Ruth pela participação, apoio, ajuda e incentivo.

À equipe do laboratório de genotipagem HLA por permitirem que todas as tipagens desse trabalho fossem realizadas.

Aos pacientes por terem aceitado participar desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este projeto fosse concluído.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	x
2. Abstract.....	xiii
3. Introdução.....	16
3.1. <i>O Complexo Principal de Histocompatibilidade.....</i>	17
3.1.1 <i>HLA e transplante de células progenitoras hematopoiéticas.....</i>	20
3.2 <i>Células Natural Killer.....</i>	21
3.2.1 <i>Receptores inibidores, ativadores e seus ligantes.....</i>	23
3.2.2 <i>Interação entre células Natural Killer e células-alvo.....</i>	26
3.3 <i>Biologia do transplante de células progenitoras hematopoiéticas.....</i>	27
3.3.1 <i>Doença do enxerto contra o hospedeiro.....</i>	29
3.4 <i>Influência das células NK e dos receptores KIR no transplante.....</i>	29
4. Objetivos.....	33
4.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	34
5. Capítulo I.....	35
6. Capítulo II.....	43
7. Discussão.....	66
8. Conclusões.....	72
9. Referências Bibliográficas	74
10. Anexos.....	87
10.1. <i>Anexo I – Tabela 1. Informações dos pacientes pelo grupo HLA-C no TCPH.....</i>	88

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1:	Características da população em estudo.....	37
Tabela 2:	Associação entre alelos HLA e DECH aguda.....	38
Tabela 3:	Associação entre alelos HLA e DECH aguda.....	38
Tabela 4:	Resultados das análises de DECH aguda severa (grau III-IV).....	39
Tabela 5:	Resultados das análises de DECH crônica severa.....	39

Capítulo II

Tabela 1:	Correlação entre DECH aguda, grupo HLA-C dos paciente e o evento morte.....	59
Tabela 2:	Correlação entre DECH aguda, grupo HLA-C do paciente e os eventos recaída e morte.....	60
Tabela 3:	Correlação entre DECH aguda, grupo HLA-C dos pacientes com leucemias e o evento e morte.....	60
Tabela 4:	Correlação entre DECH aguda, grupos HLA-C dos pacientes com leucemias e os eventos recaída e morte.....	61

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1** Frequência dos alelos HLA-A, -B, -DRB1 e -DQB1 dos 176 pacientes submetidos ao TCPH com doadores aparentados HLA compatível 38

Capítulo II

- Figura 1** Sobrevida global dos pacientes baseados no grupo HLA-C (C1 ou C2 homozigoto vs C1C2 heterozigoto)..... 56
- Figura 2** Sobrevida global dos pacientes baseado no grupo HLA-Bw (presença de Bw4 vs ausência de Bw4)..... 57
- Figura 3** Sobrevida global dos pacientes baseado nos haplótipos A e B dos doadores 57
- Figura 4** Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseados no grupo HLA-C (C1 ou C2 homozigoto vs C1C2 heterozigoto) 58
- Figura 5** Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseado no grupo HLA-Bw (presença de Bw4 vs ausência de Bw4) 58
- Figura 6** Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseado nos haplótipos A e B dos doadores 59
- Figura 7** Sobrevida livre de evento do grupo heterozigoto (C1C2) para os pacientes com e sem DECH aguda 62
- Figura 8** Sobrevida livre de evento do grupo heterozigoto (C1C2) para os paciente com leucemias, com e sem DECH aguda 62

LISTA DE ABREVIATURAS

TCPH	- Transplante de células progenitoras hematopoiéticas
NK	- <i>Natural Killer</i>
KIR	- Receptores immunoglobulin-like
HLA	- Human leukocyte antigens
CPH	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
CEP	- Comitê de ética em pesquisa
DECH	- Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
EvL	- Enxerto <i>versus</i> Leucemia
TAP	- Proteínas transportadoras associadas
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
SSP	- Iniciadores específicos de sequência
SSO	- Oligonucleotídeos específicos de sequência
CRL	- Complexo de receptores leucocitários
TMO	- Transplante de Medula Óssea
MO	- Medula Óssea
CMSP	- Células Mononucleares do sangue periférico
Mab	- Monoclonal antibodies
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
SMD	- Síndrome Mielodisplásica

1. Resumo

No organismo humano, as moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigens*) são proteínas expressas na superfície da maioria das células nucleadas e são codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo 6 na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). Essas proteínas são caracterizadas pelo alto grau de polimorfismo, e também fazem a ligação com receptores KIR (*Immunoglobulin-like Receptors*), expressos nas células *Natural Killer*. Os receptores KIR, que reconhecem moléculas do complexo HLA de classe I, estão entre os principais receptores inibidores dos linfócitos NK. Células infectadas por vírus e células tumorais perdem ou têm diminuída a expressão de moléculas HLA de classe I e, por isso, são eliminadas pela ausência de ligação entre moléculas HLA e receptores KIR inibitórios. Atualmente, muitos estudos têm destacado a importância dos genes KIR e HLA no Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH). O TCPH é o tratamento de escolha para muitas doenças hematológicas e depende de vários fatores incluindo o estágio da doença, o regime de condicionamento, a fonte de células, o grau de identidade HLA entre doador e receptor e o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Estudos recentes indicam que a presença de células NK alorreativas no enxerto representa um fator favorável à recuperação de pacientes, uma vez que essas células têm a capacidade de eliminar células tumorais residuais pela ausência ou diminuição da expressão de moléculas HLA e sem a indução da DECH. Também outros fatores podem estar envolvidos na resposta pós-transplante, como a presença e ausência de determinados alelos HLA e genes KIR, os quais podem estar ligados à melhor ou pior resposta pós-transplante. O primeiro ensaio investigou a associação entre HLA e a ocorrência da DECH aguda e crônica em pacientes que receberam transplante de células progenitoras hematopoiéticas HLA-idêntico, aparentados. No total, foram 176 pacientes que receberam o primeiro transplante entre 1997 e 2009. DECH aguda foi positivamente associada ao HLA-A10 ($P = 0.0007$), HLA-A26 ($P = 0.002$), B55 ($P = 0.001$), DRB1*15 ($P = 0.0211$) e DQB1*05 ($P = 0.038$), enquanto que HLA-B16 ($P = 0.0333$) foi mais frequente em pacientes sem DECH aguda. DECH crônica foi positivamente associada com HLA-A9 ($P = 0.01$) e A23 ($P = 0.0292$) e negativamente associada com HLA-A2 ($P = 0.0031$) e B53 ($P = 0.0116$). HLA-B35 ($P = 0.0373$), B49 ($P = 0.0155$) e B55 ($P = 0.0024$) foi alta em pacientes com DECH aguda grau 3 ou mais, do que

os outros pacientes. Nos pacientes com DECH crônica extensa, HLA-A9 ($P = 0.0004$), A24 ($P = 0.0059$) e A26 ($P = 0.0411$) foi maior do que nos outros pacientes, enquanto HLA-A2 foi baixo ($P = 0.0097$). O objetivo do segundo ensaio foi avaliar as possíveis interações dos genes KIR e HLA com o curso clínico do transplante HLA compatível, aparentado e não depletado de linfócitos T, particularmente na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica, recaída, sobrevida global e sobrevida livre de evento. A maioria dos doadores (78%) apresentaram o haplótipo B do KIR enquanto que 22% apresentaram o haplótipo A. Dos pacientes que receberam o haplótipo A do doador, 90% tiveram DECH, aguda ou crônica, comparados com os que receberam o haplótipo B (58%) (dados não estatisticamente significantes). Não houve diferença significativa para recaída entre pacientes que receberam os haplótipo A ou B (27% vs 23%). Não houve diferença no desenvolvimento da DECH e recaída para os pacientes homozigotos (C1C1 ou C2C2) e heterozigotos (C1C2) e nem para aqueles com HLA-Bw4 presente e ausente. Também, a sobrevida global não foi diferente para os grupos de pacientes analisados. No entanto, houve forte correlação entre o grupo de pacientes heterozigotos para HLA-C (C1C2) e a incidência de DECH aguda e recaída. A SLE foi maior nos pacientes heterozigotos que não desenvolveram DECHa ($p < 0,0001$). Resultados mostraram que as variantes de HLA podem influenciar na ocorrência de DECH em transplante alogênico, com doadores relacionados, HLA-idênticos, tanto como fatores de proteção, quanto como fatores de susceptibilidade. Ainda, a interação KIR/HLA tem impacto significativo no resultado dos transplantes relacionados, HLA compatível, sem depleção de linfócitos T, influenciando na incidência de recaída e na ocorrência da DECH. Resultados mostraram que para o grupo heterozigoto (C1C2) a maioria dos pacientes não desenvolveu DECH aguda e apresentou maior SLE, sugerindo um possível efeito protetor para esse grupo.

Palavras-chave: Complexo Principal de Histocompatibilidade, receptores KIR, células *Natural Killer*, células progenitoras hematopoiéticas, Doença do Enxerto contra o Hospedeiro.

2. Abstract

In the human organism, the HLA (human leukocyte antigens) are proteins expressed on the surface of most nucleated cells and are encoded by genes located on the short arm of chromosome 6 in the region of the Major Histocompatibility Complex (MHC). These proteins are characterized by a high degree of polymorphism, and also make the connection with KIR (Immunoglobulin-like Receptors), expressed in Natural Killer cells. KIR receptors that recognize HLA molecules of class I are among the major inhibitory receptors of NK-cells. Virus infected cells and tumor cells have lost or diminished expression of HLA class I molecules and therefore are eliminated by the absence of binding between HLA molecules and inhibitory KIR receptors. Currently, many studies have highlighted the importance of KIR and HLA genes in Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). HSCT is the treatment of choice for many hematological malignancies and depends on various factors including stage of disease, the conditioning regimen, the source of cells, the degree of identity between donor and recipient HLA and development of chronic graft-versus-host (GVHD). Recent studies indicate that the presence of alloreactive NK cells in the graft is a factor aiding the recovery of patients, since these cells have the ability to eliminate residual tumor cells by the absence or diminution of expression of HLA molecules and without inducing GVHD. Also other factors may be involved in response post-transplant, as the presence or absence of certain HLA genes and KIR, which can be connected to a better or worse response after transplantation. The first trial investigated the association between HLA and the occurrence of acute and chronic GVHD in patients receiving hematopoietic stem cell transplant HLA-identical related. In total, 176 patients who received a first transplant between 1997 and 2009. GVHD was positively associated with HLA-A10 ($P = 0.0007$), HLA-A26 ($P = 0.002$), B55 ($P = 0.001$), DRB1 * 15 ($P = 0.0211$) and DQB1 * 05 ($P = 0.038$), while that HLA-B16 ($P = 0.0333$) was more frequent in patients without acute GVHD. Chronic GVHD was positively associated with HLA-A9 ($P = 0.01$) and A23 ($P = 0.0292$) and negatively associated with HLA-A2 ($P = 0.0031$) and B53 ($P = 0.0116$). HLA-B35 ($P = 0.0373$), B49 ($P = 0.0155$) and B55 ($P = 0.0024$) was high in patients with acute GVHD grade 3 or more, than the other patients. In patients with extensive chronic GvHD, HLA-A9 ($P = 0.0004$), A24 ($P = 0.0059$) and A26 ($P = 0.0411$) was greater than in the other patients, whereas HLA-A2 was low ($P = 0.0097$). The

objective of the second test was to evaluate the possible interactions of KIR and HLA genes with the clinical course of the transplant HLA compatible related and not depleted of T lymphocytes, particularly in chronic graft versus host disease (GVHD) acute and chronic relapse, survival overall and event-free survival. Most donors (78%) presented the KIR B haplotype while 22% were haplotype A. Of the patients who received the donor haplotype A, 90% had GvHD, acute or chronic, compared with those who received the haplotype B (58%) (data not statistically significant). There was no significant difference in relapse between patients who received the haplotype A or B (27% vs 23%). There was no difference in the development of GVHD and relapse for patients homozygous (C1C1 or C2C2) and heterozygous (C1C2) and not for those with HLA-Bw4 present and absent. Also, the overall survival was not different for the groups of patients studied. However, there was strong correlation between the group of patients heterozygous for HLA-C (C1C2) and the incidence of acute GVHD and relapse. The SLE was higher in patients who did not develop GVHD heterozygotes ($p < 0.0001$). Results showed that the HLA variants may influence the occurrence of GVHD in allogeneic transplantation with related donors, HLA-identical, both as protective factors, such as susceptibility factors. Furthermore, the interaction KIR / HLA has a significant impact on the outcome of transplantation related HLA-compatible, without depletion of T cells, influencing the incidence of relapse and the occurrence of GVHD. Results showed that for the heterozygous group (C1C2) most patients did not develop acute GVHD and showed higher SLE, suggesting a possible protective effect for this group.

Keywords: Major Histocompatibility Complex, KIR receptor, Natural Killer cells, hematopoietic progenitor cells, Graft Versus Host disease.

3. Introdução

3.1. O Complexo Principal de Histocompatibilidade

Em humanos, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) é uma região localizada no braço curto do cromossomo 6 e tem a maior diversidade de todos os sistemas funcionais genéticos na população. A família de glicoproteínas do CPH apresenta antígenos endógenos e exógenos aos linfócitos T para o reconhecimento e início da resposta imune (Charron, 2011).

O CPH foi descoberto em 1950 por Peter Gorer e Snell George em ratos durante experimentos de enxertia de pele. As experiências mostraram que os transplantes de tecido entre animais da mesma população (endogâmica) eram bem sucedidos, enquanto que os resultados de transplantes entre animais de diferentes populações (exogâmicos) rejeitavam o enxerto (Lee et al., 2007).

Em humanos, os anticorpos induzidos por transfusão ou gravidez e que reagiram com antígenos leucocitários foram reconhecidos pela primeira vez em 1954. Estudos mostraram que os pacientes submetidos ao transplante de rim que sofreram rejeição, apresentavam anticorpos circulantes reativos aos antígenos presentes nos leucócitos. Como estes antígenos são expressos em leucócitos humanos foram nomeados pela sigla HLA, do inglês (*Human Leukocyte Antigens*) (Dausset, 2004).

O sistema HLA, representado por uma região de 3,6 Mb de DNA no braço curto do cromossoma 6, em 6p21.3, tem mais de 200 genes, a maioria dos quais têm funções relacionadas com a imunidade e está dividido em três regiões principais: classe I, II e III (Jawdat, 2012) (Figura 1).

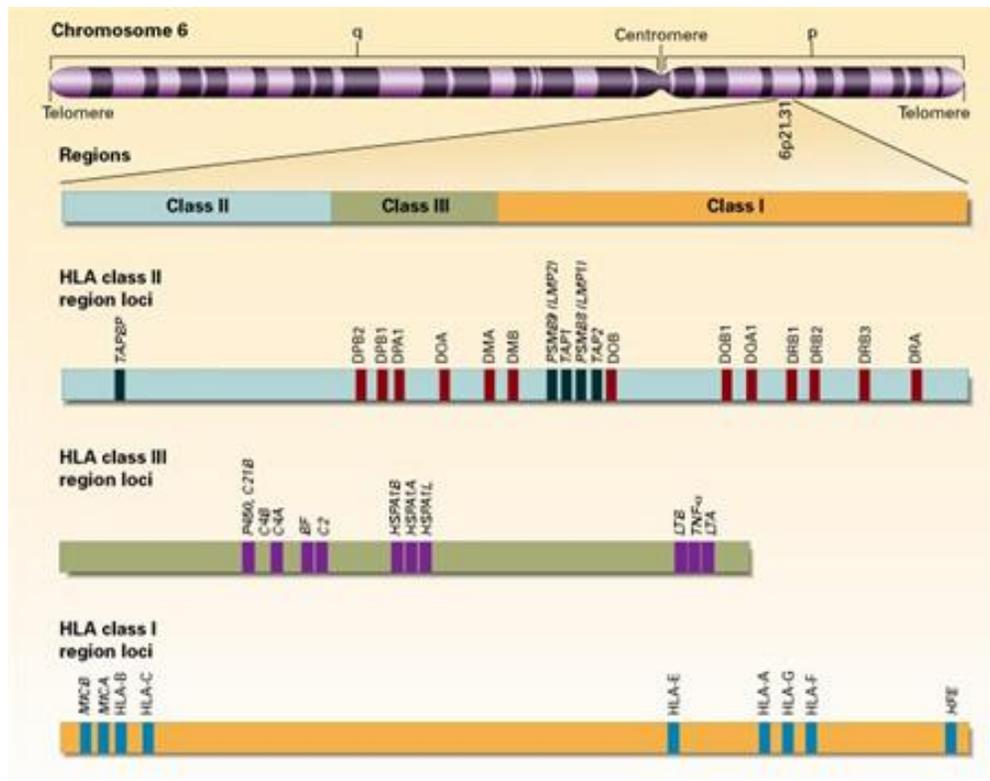


Figura 1. Cromossomo 6 e região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (Klein & Sato, 2000).

Os genes HLA-A, -B e -C são genes HLA de classe I clássicos, que apresentam um alto grau de polimorfismo em sua fenda de ligação com o peptídeo, enquanto que -E, -F, -G e -H são genes não clássicos, que possuem regiões de ligação com o peptídeo mais conservadas, além de outros genes e pseudogenes que estão localizados na região HLA classe I próximos ao telômero (Horton et al, 2004).

A região que contém os genes HLA de classe II, próxima ao centrômero, contém os genes HLA-DR, -DQ e -DP. Localizada entre as regiões de classe I e II, existe a região de classe III que contém C2, C4A, C4B e fator B, que codificam proteínas do complemento e do fator de necrose de tumor (TNF) (Horton et al, 2004 & Jawdat, 2012).

Múltiplos *loci* codificam as moléculas HLA e cada indivíduo expressa simultaneamente várias formas polimórficas de um grande conjunto de alelos na população. Além disso, ambos os alelos são expressos de maneira codominante (Seliger et al., 2008).

A estrutura tridimensional das moléculas HLA de classe I e classe II possui domínios constantes e a maior parte dos polimorfismos são encontrados na fenda de ligação do peptídeo (Bjorkman et al., 2005). (Figuras 2 e 3).

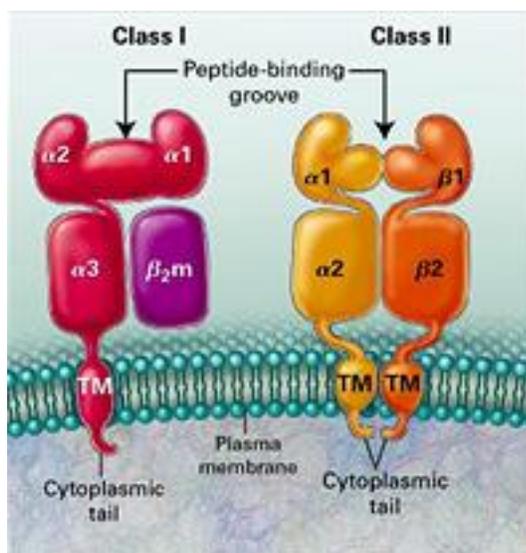


Figura 2. Estrutura das moléculas HLA de classe I e II (Klein & Sato, 2000).

Nas moléculas HLA de classe I, a fenda permite a ligação de peptídeos de 8 a 10 aminoácidos que são processados por imunoproteases no citoplasma, transportados pelo retículo endoplasmático, via proteínas transportadoras associadas ao HLA e expressos na superfície celular (TAPs) e apresentados aos linfócitos TCD8⁺. Nas moléculas HLA de classe II, a fenda permite a ligação de peptídeos de 13 a 25 aminoácidos, que são derivados do meio extracelular e apresentam os peptídeos aos linfócitos TCD4⁺ (Strominger, 2002).

O alto grau de polimorfismo presente nas moléculas HLA possibilita a apresentação de uma imensa diversidade de peptídeos aos linfócitos T, tornando possível a proteção do organismo contra a maioria das infecções e alterações genéticas.

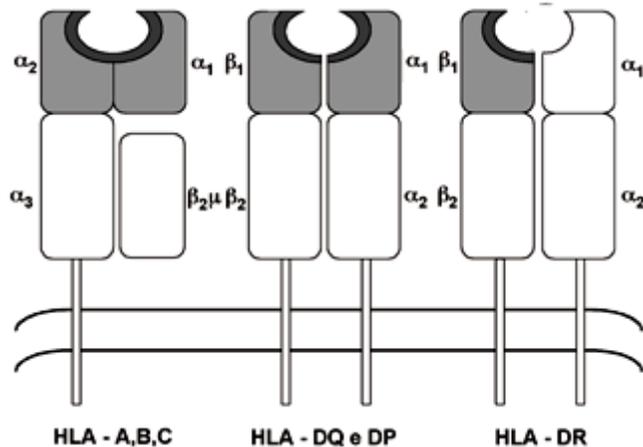


Figura 3. Regiões de maior grau de polimorfismo e apresentação do peptídeo (Fernandes et al., 2003).

3.1.1 HLA e transplante de células progenitoras hematopoiéticas

Procedimentos, como o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, podem ser mal sucedidos por conta da diversidade de alelos presentes em cada indivíduo e, por isso, a busca pela compatibilidade desses genes entre doador e receptor é importante para o bom resultado deste tipo de procedimento.

A busca pela compatibilidade HLA, aumenta as dificuldades para encontrar doadores. O paciente tem 25% de chance de ter um doador compatível entre irmãos. Esta chance torna-se uma em até um milhão, em doadores não aparentados (Marry, 2012).

O resultado do transplante com doadores aparentados ou não aparentados é altamente influenciado pela compatibilidade HLA entre o doador e receptor. Além da compatibilidade, a presença ou ausência de determinados alelos ou grupos de alelos HLA, pode estar diretamente relacionada com o curso clínico do transplante, como o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro e recaída da doença de base (Storb et al 1983; Weisdorf et al 1991; Remberger et al 2002; Adams et al., 2004 e Mohyeddin et al., 2004).

Estudos de associação e interação de moléculas HLA com outras células têm contribuído para a melhor compreensão da resposta imunológica pós-transplante. Moléculas HLA de classe I são importantes no controle das funções efetoras das células T

citotóxicas e das células *Natural Killer*, presentes na resposta imune inata (Middlenton et al., 2002).

No entanto, diferente dos linfócitos T que reconhecem o antígeno como um fragmento de peptídeo ligado ao HLA, células NK são funcionais na ausência ou diminuição da expressão de proteínas HLA de classe I nas células a serem reconhecidas (Middlenton et al., 2002).

3.2 Células *Natural Killer*

As células NK representam uma sub-população de linfócitos que são capazes de reconhecer, principalmente, células infectadas por vírus e células malignas transformadas e desencadear o reconhecimento específico sem a necessidade de sensibilização prévia. Essas células possuem granulação citoplasmática, representam cerca de 5 a 15% dos linfócitos do sangue periférico e foram caracterizadas há mais de 30 anos como efectoras citotóxicas do sistema imune inato (Kakoo & Carrington, 2006).

As NKs são células maiores que os outros tipos de linfócitos e se encontram na circulação periférica e em diversos tipos de tecidos e órgãos como medula óssea, baço, linfonodos, fígado, intestino e placenta. São capazes de migrar para locais específicos de infecção, inflamação e desenvolvimento tumoral e são ativadas pela interação de moléculas específicas expressas na superfície das células nucleadas (Malmberg et al., 2008).

Em humanos, as células NK são caracterizadas pela expressão ou ausência de expressão de alguns marcadores de superfície celular. Nas NKs, encontra-se o marcador CD56 expresso em sua superfície e a ausência da expressão de CD3 e CD19. Além disso, as células NK podem ser divididas em dois grupos baseados na diferença de expressão de CD56 e pela diferença de afinidade entre receptor de IgG e CD16 (Desbóis, 2012).

As células que expressam intensamente CD56 são chamadas de células CD56^{bright}, correspondem a cerca de 10% das células NK, as quais são chamadas de NK imunoregulatórias exibindo alta produção de citocinas. Já as células com baixa expressão de CD56 são as células CD56^{dim} que apresentam alta capacidade citotóxica e correspondem a 90% de todas as células NK (Desbóis, 2012).

As células NK foram inicialmente descritas em 1957 por dois grupos, Kiessling e Hebermann, como células imunes capazes de lisar células-alvo sem sensibilização prévia (Herberman et al., 1975 & Kiessling et al., 1975). Dentre essas células-alvo, estão as células que sofrem alterações no controle de proliferação celular e morte programada e podem se tornar células tumorais, além das células infectadas, principalmente por vírus (Karre, 2008).

Em 1981 o mecanismo de reconhecimento das células NK foi postulado pela primeira vez por Klas Karre e publicado em 1985 com a denominação de hipótese do *missing-self* ou perda de reconhecimento do próprio. Esse mecanismo faz com que as células NK sejam capazes de distinguir as células normais das células infectadas ou transformadas (Karre, 1981; Karre, 1985).

Anos depois, estudos com modelos em murinos revelaram o papel das moléculas do CPH de classe I no reconhecimento de células próprias. Em 1989, Chambers et al. (1989), conduziram experimentos identificando a primeira estrutura de superfície celular que poderia regular negativamente a atividade das células NK

Karhofer et al., (1992), foram os primeiros a identificar, em células NK murinas, o receptor inibidor Ly49 que reconhece especificamente antígenos do CPH de classe I. A família dos receptores Ly49 foram mais tarde localizados em uma região específica do cromossomo 6 que atualmente é conhecida como Complexo de genes de células NK (Yokoyama, 1993).

Em humanos, a região equivalente aos receptores murinos codificam receptores de células Natural Killer cuja estrutura é semelhante à imunoglobulina, por isso são chamados *Natural Killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs). Essa região é constituída por uma família de genes polimórficos, descritas pela primeira vez em 1990 por Moretta et al. (1990) e está localizada no cromossomo 19q13.4, em uma região chamada Complexo de Receptores Leucocitários (CRL). Com isso, houve a identificação e caracterização tanto dos receptores inibidores quanto dos receptores ativadores e como esses sinais regulam a atividade das células NK (Moretta, 1995). (Figura 4).

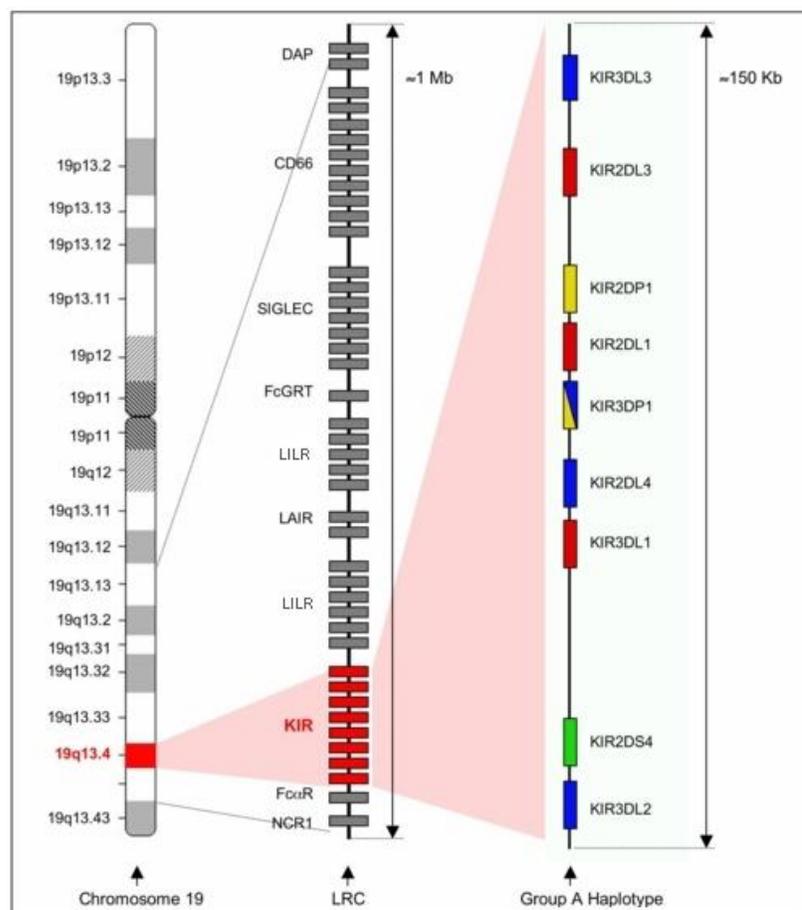


Figura 4. Localização dos genes KIR (EMBL-EBI database).

3.2.1 Receptores inibidores, ativadores e seus ligantes

Estudos iniciais afirmavam que as células NK necessitam de estímulos positivos para que ocorresse o reconhecimento de células não próprias. Posteriormente, resultados demonstraram que a atividade das células NK seria regulada pelo balanço entre sinais inibidores e ativadores e que essa sinalização ocorria de acordo com a ligação específica ou com a falta de ligação desses receptores com as moléculas HLA de classe I (Moretta & Moretta, 2004; Bryceson et al., 2008).

A atividade das células NK é controlada por sinais de receptores inibidores que são emitidos quando ocorre a ligação específica com moléculas HLA de classe I clássicas e não clássicas. Essas moléculas são normalmente expressas em células saudáveis do organismo, mas podem perder a sua expressão em células infectadas por vírus ou em células malignas

durante a evolução tumoral. Em humanos, os receptores KIR e CD94/NKG2A desempenham importante papel reconhecendo moléculas HLA dos grupos HLA-A, -B e -C e moléculas HLA-E, respectivamente (Moretta, 2004; Lanier, 2005).

Cada indivíduo tem expresso em suas células números e tipos variados de receptores KIR. Em parte, isso é explicado pela identificação de dois principais e distintos haplótipos KIR entre as populações, chamados de haplótipo A e haplótipo B e são compostos pela combinação tanto de receptores inibidores quanto ativadores (Bashirova, 2006).

Os receptores inibitórios e ativatórios têm a mesma estrutura de domínios extracelulares (2D ou 3D representam o número de domínios semelhantes a imunoglobulinas), mas têm características diferentes com relação à cauda citoplasmática, sendo que os que possuem cauda longa (L) são os receptores inibidores, enquanto que os que possuem cauda curta (S) são os receptores ativadores, além dos pseudogenes (P) que não têm função descrita (Bashirova, 2006) (Figura 5).

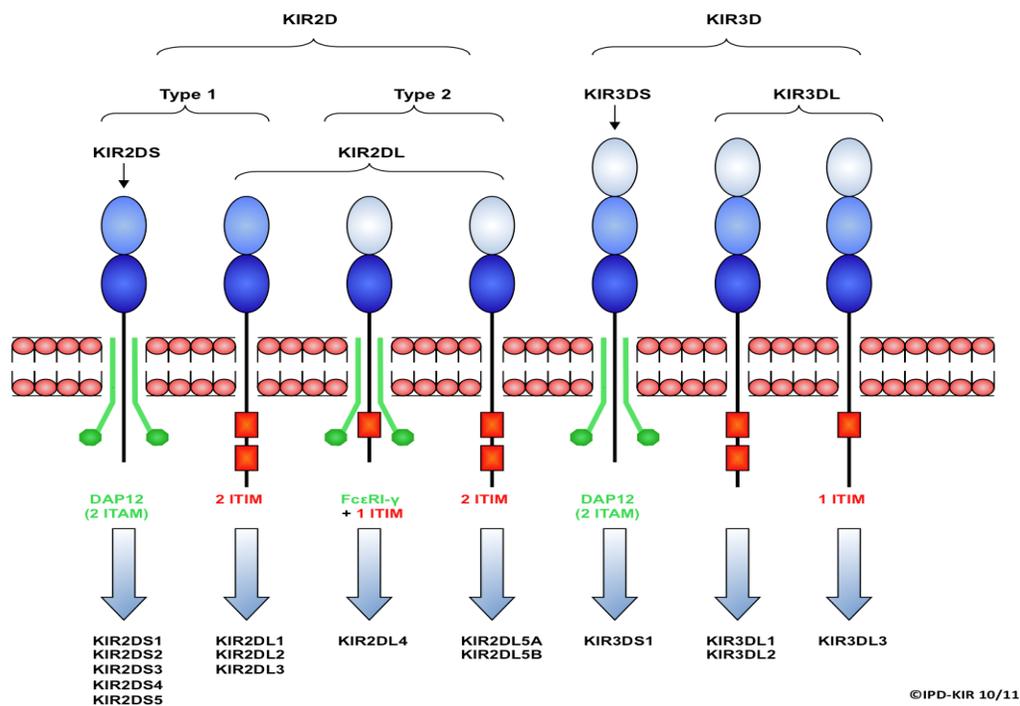


Figura 5. Estrutura dos receptores KIR (EMBL-EBI database).

O haplótipo A tem pelo menos 8 genes KIR, sendo que seis deles são receptores inibidores (KIR3DL3, KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DL2/3), um é ativador (KIR2DS4) e um é pseudogene (KIR3DP1). Em contraste, o haplótipo B pode conter até 14 genes KIR, onde vários deles são ativadores e com pelo menos um gene que não está presente no haplótipo A (Martin et al., 2000) (Figura 4 e 6).

O haplótipo B pode incluir KIR3DL3, KIR2DL2, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DS1, KIR2DL5, KIR2DS5, KIR2DS1, KIR2DS2 e KIR3DL2. Essa variedade no padrão de expressão dos receptores KIR pode ser explicada pelo fato de que produtos dos genes específicos do KIR são expressos aleatoriamente em distintos subconjuntos de células Natural Killer. Apesar desse padrão de expressão aleatória, funcionalmente as células NK expressam pelo menos um receptor inibidor (KIR e/ou CD94/NKG2A), que é ligante específico para a molécula HLA de classe I (Andersson et al., 2009) (Figura 6).

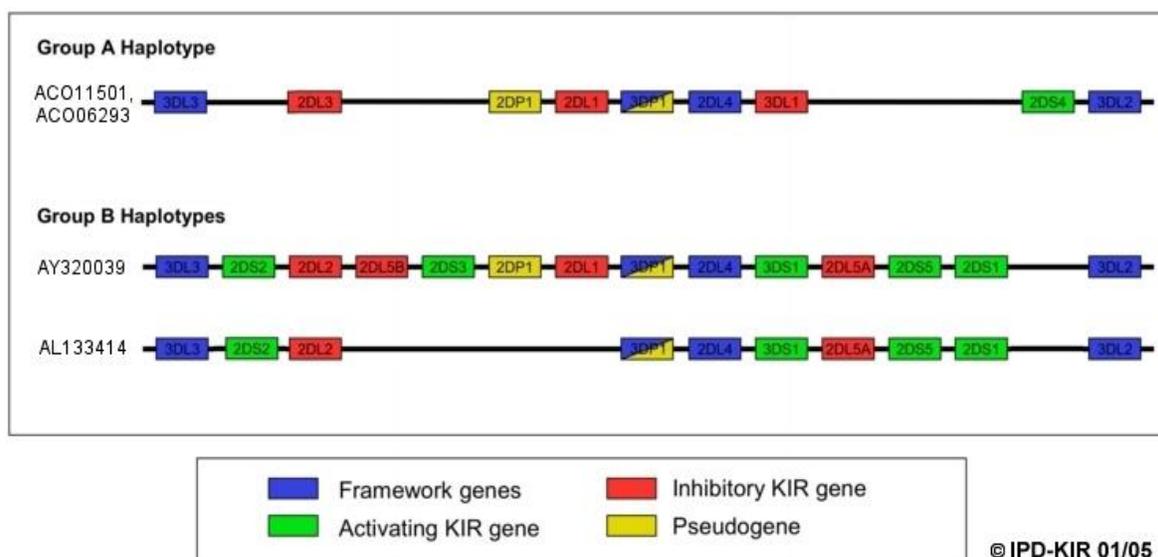


Figura 6. Haplótipos KIR do grupo A e grupo B (EMBL-EBI database).

A distribuição clonal dos receptores KIR resulta num sistema que permite que as células NK detectem as células que perdem ou tem a expressão diminuída de um único alelo HLA de classe I. É importante salientar que, em condições normais, o sinal inibidor é dominante sobre o sinal ativador nas células NK (Diefenbach et al., 2001, Ito et al., 2006).

Além dos receptores KIR e CD94/NKG2A existem também os receptores LILR-B1 que se ligam a uma variedade de moléculas HLA de classe I como HLA-Ge, os receptores KLRG1 que se ligam a proteínas caderinas em células neurais e epiteliais, o que pode contribuir para a inibição da atividade das NKs (Colonna et al., 1997; Butcher et al., 1998; Parhan, 2005; Ito et al., 2006).

Os receptores de citotoxicidade natural (NCRs), NKp30, NKp46 e NKp44 representam um importante grupo de receptores ativadores nas células NK humanas. Dois desses, NKp30 e NKp46, são expressos em todas as células NK do sangue periférico, enquanto que NKp44 é induzido por IL-2 em células NK ativadas (Moretta et al., 2001).

Os receptores ativadores NKG2D também são bem caracterizados. Eles são expressos em todas as células NK e reconhecem moléculas induzidas por estresse relacionadas a cadeia de moléculas do HLA de classe I chamadas de MICA e MICB, assim como proteínas de ligação UL16 expressas por células humanas. Muitos trabalhos demonstraram o envolvimento de NKG2D no reconhecimento de células infectadas por vírus, células tumorais e também em doenças auto-imunes (Cosman et al., 2001; Poggi & Zocchi, 2007; Guerra et al., 2008).

O receptor ativador DNAM-1 foi inicialmente descrito nos linfócitos T, no entanto, também são expressos em todas as células NK assim como em linfócitos T e monócitos. A função desse receptor é dependente da associação física de linfócitos associados a antígeno-1 (LFA-1; CD18/CD11a). Este receptor tem cooperado com NCRs e com NKG2D no reconhecimento de células NK e tem importante papel na proteção contra o desenvolvimento de células tumorais (Bryceson et al., 2006; Iguchi-Manaka et al., 2008).

3.2.2 Interação entre células *Natural Killer* e células-alvo

Todos os linfócitos têm habilidades para formar conjugados com outras células. A formação do conjugado entre células NK e a célula alvo é um processo dinâmico e é pré-requisito para que as células NK exerçam suas funções. A formação do conjugado ocorre através de uma série sequencial de passos, onde o primeiro contato é via receptores de

adesão celular que enviam sinais para a liberação de perforinas e granzimas contidas em grânulos no interior das células NK (Orange, 2008; Davis, 2009).

Resumidamente, a formação do conjugado começa com a adesão inicial induzida pelo fluxo de Ca^{2+} que une cada vez mais a célula NK com a célula alvo pelo aumento de avides e afinidade. Em seguida, ocorre a reorganização dos microtúbulos, seguida de reorientação e translocação de grânulos para o alvo (Davis, 2009).

Nesse ponto, a motilidade das células NK é diminuída por conta da reorganização do citoesqueleto. Quando as células NK estiverem polarizadas com a célula alvo e os grânulos se fundirem à membrana das células, perforinas e granzimas começam a ser liberadas no interior da célula a ser reconhecida e essa célula morre por perfuração da membrana e por apoptose (Culley et al., 2009).

Quando a célula que foi reconhecida como estranha for eliminada, as células NK recuperam a sua motilidade e podem reconhecer outras novas células circulantes, fenômeno chamado de morte sequencial (*sequential killing*) (Bhat & Watzl, 2007).

As células *Natural Killer* podem eliminar células-alvo diretamente através da liberação de seus grânulos contendo perforinas e granzimas. O exato mecanismo de penetração dos grânulos ainda não é bem conhecido, mas acredita-se que as perforinas são capazes de perfurarem a membrana da célula que está sendo reconhecida como estranha e auxiliar na entrada de outros grânulos (Chavez-Galan et al., 2009).

As granzimas induzem a apoptose pela ativação de caspases do sistema intrínseco. No entanto, a célula-alvo pode ser induzida pela interação entre receptores de morte expressos na própria célula-alvo e o seu correspondente ligante expresso por células *Natural Killer*. Esse sistema é conhecido como Faz-Faz ligante e TRAIL-TRAIL ligante que induz a apoptose via ativação de caspase-8 e caspase-9 no sistema extrínseco (Pan et al., 1997; Moulhan & Berrih-Aknin, 1998; Bolitho et al., 2007; Chavez-Galan et al., 2009).

3.3 Biologia do transplante de células progenitoras hematopoiéticas

O primeiro propósito do transplante de medula óssea é restabelecer a normalidade funcional medular, comprometida pela doença de base, para que haja novamente produção

de células sanguíneas normais. Além disso, deve-se acrescentar aos propósitos do procedimento, o de estabelecer um quimerismo, com repovoamento da medula óssea do receptor com células do doador (Guimarães, 2008).

Várias são as indicações para o transplante de medula óssea. Dentre elas, se destacam as doenças malignas: leucemias agudas e crônicas, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas e tumores sólidos como mama, ovário e cólon.

O transplante de medula também pode ser indicado para doenças não malignas como aplasia de medula, hemoglobinopatias, hemopatias congênitas e doenças auto-imunes (Guimarães, 2008).

Nos mamíferos, as células progenitoras estão no interior da medula óssea (MO) dos ossos longos e constituem uma rara população celular com cerca de 0,01 a 0,001% das células mononucleares da MO. São capazes de originar uma progênie celular que é responsável pela produção diária em humanos de 200 bilhões de hemácias, 10 bilhões de leucócitos e 400 bilhões de plaquetas (Mcculloch E & Till, 2005).

O paciente pode receber células coletadas anteriormente de sua própria medula (transplante autólogo de medula óssea) ou células coletadas a partir do sangue periférico por aférese (transplante de células periféricas autólogas).

No transplante alogênico, o paciente pode receber medula ou células periféricas de um doador relacionado HLA compatível (mais frequentemente irmão) ou não relacionado HLA compatível (doador voluntário cadastrados nos bancos de registro de doadores de medula óssea) (Astigarraga, 2006).

No entanto a dificuldade de se encontrar um doador compatível é grande e nem sempre o paciente tem a possibilidade de realizar o transplante. Por isso, estudos recentes desenvolveram protocolos para a realização de transplantes haploidênticos, que se caracterizam por serem transplantes alogênicos, mas HLA não completamente compatível.

O que pode acontecer, tanto em transplantes alogênicos HLA completamente compatíveis como em transplantes haploidênticos, é o reconhecimento das células do paciente como estranhas pelos linfócitos T do doador, fenômeno esse chamado de Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH).

3.3.1 Doença do enxero contra o hospedeiro

A DECH continua a ser causa importante de morbidade e mortalidade após transplante alogênico. Embora a susceptibilidade para esta complicação seja a incompatibilidade HLA entre doador e receptor, resultados do TCPH permanecem pouco explorados. Teoricamente, a DECH significa o reconhecimento por células T do doador de moléculas HLA próprias do hospedeiro, processadas e apresentadas como antígenos estranhos e com isso a resposta imune celular é iniciada para que as células do paciente sejam eliminadas.

Esse reconhecimento pode ocorrer devido à incompatibilidade HLA ou pela ativação dos linfócitos T do doador devido a liberação de citocinas pró-inflamatórias durante o regime de condicionamento. O regime de condicionamento parece iniciar a resposta imune pelos danos ao tecido do paciente como mucosa intestinal, fígado e outros, através da liberação de citocinas como interleucina-1 (IL-1) e TNF- α (Silva et al., 2005).

Por isso é importante a identificação de fatores de risco para que a incidência e gravidade da DECH diminuam. As moléculas HLA são as proteínas mais envolvidas nesse processo e podem contribuir para a intensidade da DECH, tanto para antígenos da classe I (HLA-A,-B e-C) quanto para os antígenos de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP).

3.4 Influência das células NK e dos receptores KIR no transplante

Estudos recentes sobre a regulação da função das células NK tem levado a um aumento na exploração do potencial clínico dessas células no transplante de medula óssea. No entanto, resultados muitos estudos controversos foram publicados a respeito do efeito provocado por células NK no pós transplante, o que pode ser explicado pela diversidade de protocolos de tratamentos que incluem: dose de células, grau de depleção de linfócitos T, supressão imune no pós transplante e profilaxia da DECH (Parham & McQueen, 2003).

Como citado anteriormente, a função das células NK é regulada pelo balanço de diferentes receptores presentes em sua superfície que podem ser de inibição ou ativação. O

maior grupo corresponde aos receptores KIR que têm como ligantes as moléculas HLA de classe I. A interação com células-alvo, na ausência de HLA ligante, pode resultar numa baixa ativação dos KIR inibidores que podem reconhecer epítopos HLA-C e HLA-Bw em células alvo, regulando a atividade de células NK. A ausência de ligante HLA de classe I em pacientes para receptores KIR inibidores de doadores pode ser um fator prognóstico para o resultado de transplante entre doador/receptor HLA idênticos ou parcialmente idênticos (Yawata et al, 2008).

Muitos estudos mostraram que em transplantes haploidênticos a alorreatividade de NK está associada com a redução do risco de recaída e melhora da sobrevida, principalmente em pacientes com LMA. Além disso, resultados semelhantes foram observados para transplantes não relacionados (Ruggeri et al., 2002; Hsu et al., 2006).

O significado clínico da perda do ligante pode ser evidenciado também no transplante alogênico, onde as células NK são os primeiros linfócitos que reconstituem o sangue periférico após o transplante, promovendo a supressão da doença enxerto contra hospedeiro (DECH), o sucesso da pega do enxerto e ainda favorecendo o efeito enxerto versus leucemia (EvL) (Asai, et al., 1998; Ruggeri, et al., 2002).

Nesse procedimento, pode ocorrer rejeição imunológica do enxerto por células imunocompetentes do receptor ou (DECH) onde os linfócitos T do doador reconhecem e eliminam as células do receptor da medula (Lazarus et al. 1997; Martin, 2000).

No entanto, após o transplante alogênico, é interessante que ocorra o efeito EvL que se caracteriza pelo reconhecimento e destruição de células leucêmicas por parte das células do doador, num processo de resposta imune contra células malignas residuais na medula do paciente chamado de resposta imune contra a doença residual mínima (Mutis & Goulmy, 2002).

Atualmente, alguns estudos mostraram que as células NK podem ter esse potencial de resposta contra a doença residual, pois se caracteriza por fazer parte da resposta imune inata e ser altamente citotóxica contra uma variedade de células tumorais frescas ou obtidas através de culturas tendo a sua atividade aumentada pelo uso de interleucina-2 (Silva et al., 1995).

Além disso, o efeito EvL, devido a alorreatividade de NK do doador, tem um papel muito importante no resultado do transplante pois diminui as chances de recaída da doença e aumenta as taxas de sobrevida (Hsu et al., 2005).

Os receptores KIR reconhecem grupos específicos de alelos HLA de classe I, portanto a alorreatividade de NK acontece quando os receptores KIR inibidores expressos não se ligam a nenhuma molécula HLA de classe I presente nas células-alvo. Além disso, para que as NK sejam alorreativas, o receptor CD94/NKG2A⁺ não pode ser expresso porque o seu ligante HLA-E está presente em todas as células que expressam HLA de classe I (Moretta et al., 2010).

Os grupos de alorreatividade para os receptores KIR inibidores são: KIR2DL1 que reconhece como próprio alelos HLA-C do grupo 2 (lisina na posição 80) e, por isso, não reconhece HLA-C do grupo 1 (asparagina na posição 80). Com isso, células C1C1 são eliminadas, enquanto que células C2C2 são preservadas. O receptor inibidor KIR2DL2/3, que reconhece alelos HLA-C do grupo C1, reconhece como estranho células C2C2 e preservam C1C1. O receptor inibidor KIR3DL1 reconhece alelos HLA-B do grupo Bw4 como próprio e eliminam células Bw6Bw6 (Pende et al. 2009).

Muitos estudos com transplante de células progenitoras hematopoiéticas alogênicas HLA compatíveis demonstraram que pacientes, onde falta o ligante HLA de classe I para o KIR inibitório do doador, apresentam melhores taxas de sobrevida livre de evento e sobrevida global, além de menores taxas de morte por recaída (Miller et al., 2007; Yu et al., 2009).

No entanto, outros estudos afirmam que a alorreatividade de NK em transplante alogênico HLA compatível pelas NK não pode acontecer e, por isso, não há melhora da sobrevida global, sobrevida livre de evento, nem DECH. A alorreatividade de NK não é esperada em transplantes HLA compatíveis pois as células *Natural Killer* do doador teoricamente são transferidas para um ambiente “geneticamente” igual ao do doador e, por isso, mecanismos de tolerância fazem com que as NKs sejam hiporresponsivas (Bjourklund et al., 2010).

Outros autores tentam explicar que durante a maturação de NK e a recuperação do repertório de receptores KIR nos primeiros dias do pós transplante acontece a quebra de

tolerância do próprio e, por isso, essas células são capazes de reconhecer células do paciente, onde não existe o ligante HLA específico para o KIR inibitório das NKs do doador como estranhas e ativar a resposta imune (Hsu et al., 2005; Yu et al., 2009).

Outro ponto importante está no fato do transplante ser depletado de linfócitos T ou não depletado. Particularmente, a presença de linfócitos T no enxerto antagoniza a recuperação do potencial alorreativo das células NK representado pelos receptores KIR (Andersson, 2012).

Trabalhos demonstraram alorreatividade de NK em transplantes onde as células T do enxerto foram retiradas. Nesses casos, a alorreatividade pode acontecer pois a maturação de NKs ocorre primeiro e a resposta imune inata é a predominante devido ao fato de não haver a presença de linfócitos T do doador (Bjouklund, 2010).

Outros ensaios afirmam existir alorreatividade de NK em transplantes não depletados de linfócito T e por isso o efeito EvL também pode acontecer em transplantes não depletados de T onde existe falta do ligante HLA para o KIR específico (Sobecks et al., 2007; Linn et al., 2010).

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Investigar a associação dos polimorfismos dos genes KIR e HLA com o curso clínico do transplante HLA compatível, aparentado e não depletado de linfócitos T, particularmente na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica, recaída da doença de base, sobrevida global e sobrevida livre de evento.

5. Capítulo I

Association between human leukocyte antigens and graft-versus-host disease occurrence after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Associação entre antígenos leucocitários humanos e a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro após o transplante alogênico decélulas-tronco hematopoieticas

Daniela Máira Cardozo^I, Sofia Rocha Lieber^{II}, Sílvia Barbosa Dutra Marques^{III}, Francisco José Aranha^{IV}, Afonso Celso Vigorito^V, Cármino Antonio de Souza^V, Jeane Eliete Laguilá Visentainer^{VI}

Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

^IMSc. Doctoral Student in Clinical Medicine, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{II}MSc, PhD, Biomedic, HLA Laboratory, Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{III}MSc. Supervisor, HLA Laboratory, Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{IV}MD, PhD, Hematologist, Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^VMD, PhD, Titular Professor, Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{VI}MSc, PhD. Adjunct Professor, Department of Basic Health Science, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil.

KEY WORDS:

Graft vs host disease.
Histocompatibility antigens.
Hematopoietic stem cells.
Polymorphism, genetic.
Transplants.

PALAVRAS-CHAVE:

Doença enxerto-hospedeiro.
Antígenos de histocompatibilidade.
Células-tronco hematopoieticas.
Polimorfismo genético.
Transplantes.

ABSTRACT

CONTEXT AND OBJECTIVE: Graft-versus-host disease (GVHD) is one of the complications following allogeneic stem cell transplantation. This study investigated an association between human leukocyte antigen (HLA) and the occurrence of acute and chronic GVHD in patients who had received stem cell transplantations from HLA-identical siblings.

DESIGN AND SETTING: Retrospective study at Hematology and Hemotherapy Center, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

METHODS: The participants were 176 patients whose first transplant was between 1997 and 2009. HLA genotyping was performed serologically and using the polymerase chain reaction with specific primer sequence.

RESULTS: Acute GVHD was positively associated with HLA-A10 ($P = 0.0007$), HLA-A26 ($P = 0.002$), B55 ($P = 0.001$), DRB1*15 ($P = 0.0211$) and DQB1*05 ($P = 0.038$), while HLA-B16 ($P = 0.0333$) was more frequent in patients without acute GVHD. Chronic GVHD was positively associated with HLA-A9 ($P = 0.01$) and A23 ($P = 0.0292$) and negatively with HLA-A2 ($P = 0.0031$) and B53 ($P = 0.0116$). HLA-B35 ($P = 0.0373$), B49 ($P = 0.0155$) and B55 ($P = 0.0024$) were higher in patients with acute GVHD grade 3 or above, than in other patients. In patients with extensive chronic GVHD, HLA-A9 ($P = 0.0004$), A24 ($P = 0.0059$) and A26 ($P = 0.0411$) were higher than in other patients, while HLA-A2 was lower ($P = 0.0097$).

CONCLUSION: This study suggests that HLA can influence the incidence and severity of acute and chronic GVHD. However, a study with a better design and more patients will be needed to confirm these results.

RESUMO

CONTEXTO E OBJETIVO: A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma das complicações pós-transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas. Este estudo investigou uma associação entre o antígeno leucocitário humano (HLA) e a ocorrência de DECH aguda e crônica, em pacientes que receberam transplantes de irmãos HLA-identéticos.

TIPO DE ESTUDO E LOCAL: Estudo retrospectivo no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

MÉTODOS: Os participantes foram 176 pacientes cujo primeiro transplante foi entre 1997 e 2009. A tipagem HLA foi realizada por sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) com sequência específica de primers.

RESULTADOS: A DECH aguda foi associada positivamente com HLA-A10 ($P = 0,0007$), HLA-A26 ($P = 0,002$), B55 ($P = 0,001$), DRB1*15 ($P = 0,0211$) e DQB1*05 ($P = 0,038$), enquanto HLA-B16 ($P = 0,0333$) foi mais frequente em pacientes sem DECH aguda. A DECH crônica foi associada positivamente com HLA-A9 ($P = 0,01$) e A23 ($P = 0,0292$) e, negativamente, com HLA-A2 ($P = 0,0031$) e B53 ($P = 0,0116$). HLA-B35 ($P = 0,0373$), B49 ($P = 0,0155$) e B55 ($P = 0,0024$) estavam aumentados em pacientes com DECH aguda grau 3 ou maior, em comparação aos outros pacientes. Em pacientes com DECH crônica extensa, HLA-A9 ($P = 0,0004$), A24 ($P = 0,0059$) e A26 ($P = 0,0411$) estavam aumentados em comparação aos outros pacientes, enquanto HLA-A2 estava diminuído ($P = 0,0097$).

CONCLUSÕES: Este estudo sugere que o HLA pode influenciar a ocorrência de DECH aguda e crônica e a sua gravidade. No entanto, um estudo com melhor desenho e com mais pacientes será necessário para confirmar esses resultados.

INTRODUCTION

Graft-versus-host disease (GVHD) remains an important source of morbidity and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Although susceptibility to this complication has been shown to be influenced by the immunogenetic background of the donor/recipient pair,^{1,2} the potential impact of human leukocyte antigen (HLA)-like genes on HSCT outcomes remains poorly explored.

Under these circumstances, donor T-cell recognition of host HLA can give rise to GVHD, and host recognition of donor HLA may increase the risk of graft failure. Identifying GVHD risk factors may help to reduce its incidence and severity. Previous reports have suggested that particular HLA system factors have an impact on GVHD³⁻¹¹ and give rise to a reduced relapse rate and improved survival after HSCT.¹²

HLA molecules are the most important immunogenic proteins contributing towards the intensity of the GVHD reaction.¹³ Class I antigens (HLA-A, -B and -C) and Class II antigens (DR, DQ and DP) are the classical molecules in the major histocompatibility complex (MHC), which are encoded by MHC in chromosome 6. HLA antigens from host tissues are recognized by donor T cells that are critical for the development of both acute and chronic GVHD.

To our knowledge, in Brazil, there have not been any studies investigating an association between HLA and GVHD development. Consequently, there is intense interest in defining the best HLA genetic markers for allogeneic HSCT outcomes and incorporating these into routine donor selection strategies in the Brazilian population.

OBJECTIVE

The objective of this study was to investigate an association between HLA and the occurrence of acute and chronic GVHD in patients who had received stem cell transplantation from HLA-identical siblings in a Brazilian population.

PATIENTS AND METHODS

Study design and data collection

The clinical records of allogeneic HSCT recipients in one hematology and hemotherapy center were retrospectively reviewed and 176 patients who had received a first matched-sibling allogeneic HSCT between 1997 and 2009 were found. These patients were followed up to ascertain their clinical outcomes up to the cutoff point of June 2010. The characteristics of the study population are presented in Table 1.

Only patients who developed acute GVHD or survived for more than 100 days without GVHD, and were therefore at risk of developing acute GVHD, were included in the analyses for acute GVHD. For chronic GVHD, patients who had developed chronic GVHD or survived for more than 110 days without chronic GVHD were included.

All of the patients and donors were residents of Campinas and the surrounding region in the State of São Paulo and were classified as a mixed population due to their genetic background of European, African and Amerindian origin.

This study was conducted in accordance with the guidelines of the Ethics Committee of the University Hospital of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Table 1. Characteristics of the study population (n = 176)

Characteristic	
Average patient age in years (range)	34.0 (1-60)
Average donor age in years (range)	32.0 (1-62)
Recipient-donor gender - n (%)	
M/M	57 (32.4%)
M/F	51 (29.0%)
F/M	33 (18.7%)
F/F	35 (19.9%)
Diagnosis - n (%)	
AA	23 (13.1%)
PNH	4 (2.3%)
ALL	25 (14.2%)
AML	42 (23.9%)
CML	73 (41.5%)
CMML	2 (1.1%)
MDS	6 (3.4%)
Source of cells - n (%)	
Bone marrow	104 (59.1%)
Peripheral blood stem cell	72 (40.9%)

M = male; F = female; AA = aplastic anemia; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; ALL = acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myeloid leukemia; CML = chronic myeloid leukemia; CMML = chronic myelomonocytic leukemia; MDS = myelodysplastic syndrome.

GVHD assessment

Occurrences of GVHD were classified in accordance with Glucksberg et al.¹⁴ and Atkinson et al.¹⁵ In our study, we classified grades 0 to II as mild acute GVHD and grades III to IV as severe acute GVHD. Chronic GVHD was considered to be severe when it was classified as extensive.

HLA genotyping

HLA matching was performed serologically for HLA-A and -B antigens (One Lambda, Canoga Park, CA, USA), and for HLA-DRB1 and -DQB1 using molecular typing (Dynal sequence-specific primer, Dynal Ltd., Bromborough, Wirral, UK; One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

Statistical analysis

Screening for associations between HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 and DQB1 variants and GVHD incidence was carried out using chi-square statistics with Yates correction or Fisher's exact test when needed. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were also calculated. P values < 0.05 were considered statistically significant, but to account for multiple comparisons, the observed

P values were corrected by means of Bonferroni's correction. The P value was multiplied by the number of comparisons made. The resulting corrected $P_c < 0.05$ was accepted as significant. Cumulative incidences were calculated for acute and chronic GVHD.

RESULTS

Patients and donors

The patients were 108 men and 68 women with a median age of 34 years (range: 1-60 years) and the donors were 90 men and 86 women with a median age of 32 years (range: 1-62 years). The conditioning therapy, GVHD prophylaxis, GVHD treatment, transplantation procedures and clinical support have been described elsewhere.^{16,17}

Occurrence of acute and chronic GVHD

In total, 150 patients showed no evidence of acute GVHD or developed acute GVHD grade I; 11 (42.3%) had grade II; 11 (42.3%) had grade III; and 4 (15.4%) had grade IV. The cumulative occurrence of acute GVHD of grades II-IV was 14.8%. A total of 140 patients were evaluated for chronic GVHD: 22 (15.7%) developed the limited and 58 (41.4%) the extensive clinical form. The cumulative occurrence of chronic GVHD was 57.1%.

Frequency of HLA variants in GVHD

The frequencies of the HLA class I and II variants in patients who received a HSCT are shown in Figure 1. By cross-tabulating each HLA variant with the occurrence of GVHD, ten variants were found to be associated with either the presence or the absence of GVHD with $P < 0.05$. These HLA variants were A2, A9, A10, A23, A26, B16, B53, B55, DRB1*15 and DQB1*05, as shown in Tables 2 and 3. After Bonferroni's correction, the HLA-A10, -A26 and -B55 variants remained statistically significant.

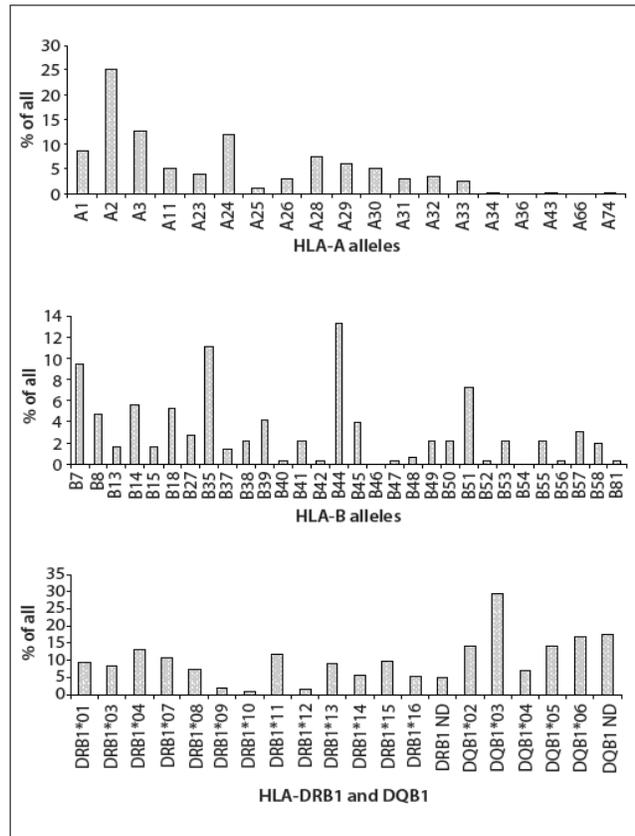


Figure 1. Human leukocyte antigen (HLA)-A, -B, -DRB1 and -DQB1 allele frequencies among 176 hematopoietic stem-cell transplant (HSCT) patients with HLA-identical sibling donors.

Table 2. Association between human leukocyte antigen (HLA) alleles and acute graft-versus-host disease (aGVHD)

HLA allele	n	aGVHD		P	OR	95% CI
		grades 0-I (%)	grades II-IV (%)			
		n = 150				
A10	7	2.3	7	0.0007	6.51	2.18-19.44
A26	5	1.7	6	0.0020	7.70	2.26-26.25
B16	23	7.7	0	0.0333	0.12	0.01-1.96
B55	2	0.7	5	0.0010	15.85	2.99-84.07
DRB1*15	25	8.6	9	0.0211	2.91	1.25-6.77
DQB1*05	38	15.2	12	0.0380	2.39	1.12-5.11

n = number of alleles; P = probability; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

Table 3. Association between human leukocyte antigen (HLA) alleles and chronic graft-versus-host disease (cGVHD)

HLA allele	n	cGVHD		P	OR	95% CI
		absence (%)	presence (%)			
		n = 58				
A2	41	35.3	31	0.0031	0.43	0.25-0.74
A9	10	8.6	34	0.0100	2.77	1.31-5.87
A23	1	0.9	10	0.0292	7.47	0.94-59.17
B53	5	4.3	0	0.0116	0.07	0.0-1.25

n = number of alleles; P = probability; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

Frequency of HLA variants in acute and chronic GVHD

Table 2 shows the significant frequencies of HLA associated with acute GVHD. Acute GVHD (grades 0-I) was positively associated with HLA-A10 ($P = 0.0007$; $P_c = 0.0133$), HLA-A26 ($P = 0.002$; $P_c = 0.038$), B55 ($P = 0.001$; $P_c = 0.033$), DRB1*15 ($P = 0.0211$; $P_c = 0.2743$) and DQB1*05 ($P = 0.038$; $P_c = 0.19$). HLA-B16 was more frequent in patients who did not develop acute GVHD (grades 0-I), but this difference did not remain significant after Bonferroni's correction ($P = 0.0333$; $P_c = 1.099$).

Chronic GVHD was positively associated with HLA-A9 ($P = 0.01$; $P_c = 0.19$) and A23 ($P = 0.0292$; $P_c = 0.5548$), and negatively with A2 ($P = 0.0031$; $P_c = 0.0589$) and B53 ($P = 0.0116$; $P_c = 0.3828$).

Frequency of HLA variants in severe acute and chronic GVHD

Table 4 compares the frequencies of HLA in relation to severe acute GVHD. It shows that the HLA-B35 ($P = 0.0373$; $P_c = 1.2309$), B49 ($P = 0.0155$; $P_c = 0.5115$) and B55 ($P = 0.0024$; $P_c = 0.0792$) variants were higher in patients with acute GVHD grade 3 or above, than in other patients.

In patients with extensive chronic GVHD, the HLA-A9 ($P = 0.0004$; $P_c = 0.0076$), A24 ($P = 0.0059$; $P_c = 0.1121$) and A26 ($P = 0.0411$; $P_c = 0.7809$) variants were higher than in other patients, as shown in Table 5. HLA-A2 was lower in these patients ($P = 0.0097$; $P_c = 0.1843$).

DISCUSSION

Many studies have analyzed risk factors for GVHD in relation to HLA, cytokines, killer immunoglobulin-like receptors (KIR) and other variants.^{3-11,18-24}

Our analysis investigated the role of class I and II HLA variants on GVHD development in a population of 176 patients, and suggests that these were determinants for acute and chronic GVHD in allogeneic HSCT patients with an HLA-identical sibling donor. HLA-A26 (a split of HLA-A10) was associated with higher risk of acute GVHD, in agreement with previous studies.^{3,5,7,9,11}

According to Bross et al.,⁸ HLA-A19 and B17 were associated with a lower risk of acute GVHD, whereas HLA-Cw4, A-11 and B21 appeared to be associated with a higher risk. Our data were concordant with this, showing an association between HLA-B49 (a split of HLA-B21) and severe acute GVHD. However, HLA-B35 was associated with a higher risk of severe acute GVHD, in contrast with the findings of Storb et al. and Ghavamzadeh et al.^{5,10}

We did not find any correlation between acute GVHD risk and HLA-A3 and A11, in contrast with the findings of Clark et al. and Bross et al., respectively,^{6,8} and likewise in relation to HLA-DR1⁶ and DR3.⁷

While the present study showed that HLA-DRB1*15 and DQB1*05 (one of the alleles in linkage disequilibrium with DRB1*15) were higher in patients with acute GVHD (grades II to IV), Battiwala et al. identified absence of HLA-DR15 as a factor significantly associated with acute GVHD.⁴ However, there is a hypothesis that immunodominant myeloid antigens are preferentially presented by HLA-DR15, thus suggesting that this allele has an important role in relation to acute GVHD development.

Several factors could explain these differential results, including patients who received transplants from unrelated donors and the use of serological typing methods in a subgroup of patients, whereas all individuals in our cohort received transplants from HLA-identical siblings and were typed as HLA class II using molecular methods. It is worth noting that our study has an

Table 4. Results from analysis on severe (grades III-IV) acute graft-versus-host disease (aGVHD)

HLA allele	n	aGVHD		P	OR	95% CI
		grades 0-II (%)	grades III-IV (%)			
		n = 161	n = 15			
B35	30	9.3	23.3	0.0373	2.96	1.17-7.48
B49	4	1.2	10.0	0.0155	8.33	1.88-41.52
B55	4	1.2	13.3	0.0024	12.23	2.89-51.75

n = number of alleles; P = probability; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

Table 5. Results from analysis on severe (extensive) chronic graft-versus-host disease (cGVHD)

HLA allele	n	cGVHD		P	OR	95% CI
		absence or limited (%)	extensive (%)			
		n = 80	n = 60			
A2	51	31.9	17.5	0.0097	0.45	0.25-0.81
A9	14	8.8	25.0	0.0004	3.48	1.57-6.91
A24	11	6.9	18.3	0.0059	3.04	1.41-6.55
A26	2	1.3	5.8	0.0411	4.89	1.00-24.00

n = number of alleles; P = probability; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

important limitation regarding clinical application, due to the statistical method used.

Moreover, Stern et al. reported that DRB1*15 showed an association with lower disease relapse and greater survival in patients treated with HSCT for leukemia or non-Hodgkin lymphoma, but they did not observe any significant difference regarding the incidence of acute GVHD.¹² In our view, DRB1*15 could reduce the graft-versus-leukemia effect after HSCT, thereby increasing the incidence of GVHD.

Our study also suggested that other HLA antigens were associated with acute GVHD, such as HLA-B16 (protection factor) and B55 (susceptibility factor), which were also associated with GVHD severity.

This study found statistically significant differences in the occurrence and severity of chronic GVHD. HLA-A9 (A23 or A24) was positively associated with both of them, while HLA-A2 was associated with protection. HLA-B53 was associated with chronic GVHD development, but not with the severe (extensive) form, while HLA-A26 was associated with extensive chronic GVHD. Although HLA-A26 has been associated with acute GVHD and severe chronic GVHD, the immunopathogenesis of these GVHD forms are different, which could explain the different associations observed with the forms of disease.

Few studies have investigated an association between HLA and chronic GVHD. Remberger et al. found that HLA-B27 was associated with a lower risk of developing chronic GVHD.⁹ According to Battiwalla et al., there was no significant difference in the two groups, regarding chronic GVHD incidence or severity.⁴

The differences between various HLA variants and their correlations with the risk of GVHD in different centers and countries may be due to differences in ethnicity between populations. In addition to these differences, we emphasize that our study had limitations relating to its design and the number of patients.

CONCLUSION

These results show that MHC variants may influence the occurrence of GVHD in HSCT with HLA-identical sibling donors. However, we suggest that collaborative studies using larger central registry datasets should be conducted in order to explore clinical outcomes according to HLA antigen status in HLA-matched allogeneic stem cell transplantation.

REFERENCES

- Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):517-25.
- Charron D. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):493-7.
- Mohyeddin Bonab M, Alimoghaddam K, Vatandoust S, et al. Are HLA antigens a risk factor for acute GVHD in thalassemic patients receiving HLA-identical stem cell transplantation? *Transplant Proc.* 2004;36(10):3190-3.
- Battiwalla M, Hahn T, Radovic M, et al. Human leukocyte antigen (HLA) DR15 is associated with reduced incidence of acute GVHD in HLA-matched allogeneic transplantation but does not impact chronic GVHD incidence. *Blood.* 2006;107(5):1970-3.
- Storb R, Prentice RL, Hansen JA, Thomas ED. Association between HLA-B antigens and acute graft-versus-host disease. *Lancet.* 1983;2(8354):816-9.
- Clark RE, Hermans J, Madrigal A, et al. HLA-A3 increases and HLA-DR1 decreases the risk of acute graft-versus-host disease after HLA-matched sibling bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;114(1):36-41.
- Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation.* 1991;51(6):1197-203.
- Bross DS, Tutschka PJ, Farmer ER, et al. Predictive factors for acute graft-versus-host disease in patients transplanted with HLA-identical bone marrow. *Blood.* 1984;63(6):1265-70.
- Remberger M, Persson U, Hauzenberger D, Ringdén O. An association between human leukocyte antigen alleles and acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2002;119(3):751-9.
- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Behrouzan O, et al. HLA and risk of acute graft versus host disease in allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Arch Iran Med.* 2002;5(1):16-20. Available from: <http://www.ams.ac.ir/AIM/0251/aim025116.htm>. Accessed in 2011 (Nov 22).
- Adams KM, Holmberg LA, Leisenring W, et al. Risk factors for syngeneic graft-versus-host disease after adult hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2004;104(6):1894-7.
- Stern M, Passweg J, Tiercy JM, et al. Human leukocyte antigen DR15 is associated with reduced relapse rate and improved survival after human leukocyte antigen-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(11):1169-75.
- Petersdorf EW, Malkki M. Genetics of risk factors for graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* 2006;43(1):11-23.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295-304.
- Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, et al. Consensus among bone marrow transplanters for diagnosis, grading and treatment of chronic graft-versus-host disease. Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(3):247-54.
- Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31(11):1044-50.
- Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood

- progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(12):1145-51.
18. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2201-10.
 19. Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, et al. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine*. 2005;32(3-4):171-7.
 20. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005;105(12):4878-84.
 21. Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, et al. IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol*. 2007;66(6):703-10.
 22. Azarpira N, Ramzi M, Aghdai MH, Darai M, Geramizadeh B. Interleukin-10 gene polymorphism in bone marrow transplant recipients. *Exp Clin Transplant*. 2008;6(1):74-9.
 23. Schellekens J, Rozemuller EH, Petersen EJ, et al. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Mol Immunol*. 2008;45(8):2255-61.
 24. Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas [Importance of regulatory cytokine gene polymorphisms in hematopoietic stem cell transplantation]. *RBCF Rev Bras Ciênc Farm (Impr)*. 2008;44(4):739-48.

Acknowledgements: We would like to thank the staff and friends of the HLA Laboratory of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) who contributed to this work

Sources of funding: None

Conflict of interest: None

Date of the first submission: January 21, 2010

Last received: December 13, 2011

Accepted: December 19, 2011

Address for correspondence:

Jeane Eliete Laguila Visentainer
Av. Colombo, 5.790, Zona 07
Maringá (PR) — Brasil
CEP 87020-900
Tel. (+55 44) 3011-4864
Fax. (+55 44) 3011-4931
E-mail: jelvisentainer@gmail.com
E-mail: jelvisentainer@uem.br

São Paulo, 04 de abril de 2013

DECLARAÇÃO

O editor da revista São Paulo Medical Journal, prof. dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, autoriza a colocação do artigo "Association between human leukocyte antigens and graft-versus-host disease occurrence after allogenic hematopoietic stem cell transplantation", publicado na São Paulo Medical Journal, volume 130, edição número 4, na sua tese de doutorado

*Prof. Dr. Álvaro Nagib Atallah
Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes
Editor - São Paulo Medical Journal/
Evidence for Health Care
Triênio 2011-2014*

6. Capítulo II

A diversidade dos genes KIR e o impacto dos genótipos KIR/HLA em doadores-pacientes no resultado do transplante de células progenitoras hematopoiéticas para doenças onco-hematológicas em pacientes Brasileiros

The diversity of KIR genes and the impact of donor-patient KIR /HLA genotypes on outcome following HLA-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy in Brazilian patients.

Daniela Maira Cardozoⁱ, Jeane Eliete Laguila Visentainerⁱⁱⁱ, Amanda Vansan Marangonⁱ, Francisco José Aranhaⁱ, Eliana Mirandaⁱ, Fernando Guimarãesⁱⁱ, Carmino Antonio de Souzaⁱ

ⁱⁱⁱCentro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

ⁱⁱLaboratórios Clínicos Especializados, Centro de atenção intensiva à saúde da mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{III}Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil.

Resumo

Foi proposto que a ausência de expressão da molécula HLA de classe I nos pacientes, ligante para receptores KIR inibidores presentes nas células dos doadores, poderia ser utilizada como fator prognóstico para o resultado dos transplantes com células progenitoras hematopoiéticas entre doador/receptor HLA idênticos. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis interações dos genes KIR e HLA com o curso clínico do transplante HLA compatível, aparentado e não depletado de linfócitos T, particularmente na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica, recaída, sobrevida global e sobrevida livre de evento. O estudo foi prospectivo, realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os participantes foram 50 pacientes com os respectivos doadores, cujo transplante foi entre 2008 e 2012. A tipagem HLA foi realizada pela reação em cadeia da polimerase com sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSOP baseada na tecnologia Luminex[®]). A maioria dos doadores (78%) apresentaram o haplótipo B do KIR, enquanto que 22% apresentaram o haplótipo A. Dos pacientes que receberam o haplótipo A do doador, 90% tiveram DECH, aguda ou crônica, comparados com os que receberam o haplótipo B (58%) (dados não estatisticamente significantes). Não houve diferença significativa para recaída entre pacientes que receberam os haplótipo A ou B (27% vs 23%). Não houve diferença no desenvolvimento da DECH e recaída para os pacientes homozigotos (C1C1 ou C2C2) e heterozigotos (C1C2) e nem para aqueles com HLA-Bw4 presente e ausente. Além disso, a sobrevida global não foi diferente para os grupos de pacientes analisados. No entanto, houve forte correlação entre o grupo de pacientes heterozigotos para HLA-C (C1C2) e a incidência de DECH aguda e recaída. A SLE foi maior nos pacientes heterozigotos que não desenvolveram DECHa ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: HLA, KIR, células *Natural Killer*, transplante de células progenitoras hematopoiéticas, DECH aguda.

Introdução

Foi proposto que nos transplantes com células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) para o tratamento das doenças onco-hematológicas, a ausência de expressão da molécula HLA de classe I nos pacientes, ligante para receptores KIR inibidores presentes nas células dos doadores, poderia ser utilizado como fator prognóstico para o resultado dos transplantes entre doador/receptor HLA idênticos (Yawata et al, 2008). O fato dos genes KIR e HLA de classe I estarem localizados em cromossomos diferentes (cromossomos 19q13.4 e 6pq respectivamente) e, portanto, segregarem independentemente, possibilita que ocorram assincronias entre os repertórios KIR e HLA de classe I de um indivíduo (Khakoo & Carington 2006). Como consequência, células NK alorreativas podem se originar após os TCPH, ou seja, células NK que expressam receptor KIR inibidor no doador, para o qual a molécula HLA de classe I ligante específica está ausente no paciente (Velardi 2012).

O significado clínico da ausência do ligante HLA de classe I foi primeiro evidenciado em transplantes haploidênticos para tratamento da leucemia mieloide aguda (LMA), nos quais observou-se a redução do risco de ocorrer recaída, melhora na sobrevida e redução de complicações pós-transplante, como o desenvolvimento da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) (Asai et al. 1998, Ruggeri et al. 2002).

Uma vez que os receptores KIR reconhecem grupos de alelos da molécula HLA de classe I, foi possível se estabelecer os principais receptores KIR envolvidos no reconhecimento alorreativo de células deficientes na expressão de um ou mais ligantes HLA de classe I. Com isso, o KIR2DL1 reconhece como próprio as moléculas HLA-Cw do grupo 2 (HLA-C2), os quais se caracterizam pela presença do resíduo lisina na posição 80 da molécula. Os receptores inibidores KIR2DL2 e KIR2DL3 reconhecem moléculas HLA-Cw do grupo 1 (HLA-C1), os quais se caracterizam pela presença do resíduo de asparagina na posição 80 da molécula (Khakoo & Carington 2006). No TCPH de um doador que possui o gene *KIR2DL1* para um paciente homólogo para os alelos HLA do grupo C1

(C1C1), embora seja um transplante HLA compatível, poderá haver células NK que expressam o receptor KIR2DL1 para o qual não haverá ligante específico. Do mesmo modo, no transplante a partir de um doador que possui o gene *KIR2DL2/3* para um paciente homólogo para os alelos HLA do grupo C2 (C2C2), poderão emergir células NK que expressam o receptor KIR2DL2/3, para o qual não haverá ligante específico. Além dos grupos HLA-C, alelos HLA do grupo Bw4 são ligantes específicos do receptor inibidor KIR3DL1 e a ausência deste HLA no paciente transplantado com células progenitoras hematopoiéticas de doador que possui o gene *KIR3DL1*, também pode originar células NK para as quais não haverá ligante específico, ou seja, células NK alorreativas (Pende et al. 2009).

Estudos prévios demonstraram que a interação KIR/HLA tem impacto significativo no resultado dos transplantes haploidênticos, não relacionados e relacionados HLA compatíveis, influenciando na recaída e na DECH (Hsu et al., 2005, Miller et al., 2007, Clausen et al., 2007). No entanto, outros estudos mostraram a ausência de alorreatividade das células NK e de melhora na sobrevida global, sobrevida livre de evento, recaída e DECH nos transplantes alogênicos HLA compatíveis (Bjourklund et al. 2010). Com isso, o objetivo neste estudo foi investigar as possíveis interações dos genes KIR e HLA com o curso clínico do transplante HLA compatível, aparentado e não depletado de linfócitos T, particularmente na DECH aguda e crônica, recaída, sobrevida global e sobrevida livre de evento.

Sujeitos e Métodos

Pacientes

Neste estudo, foram incluídos 50 pacientes com seus respectivos doadores, que receberam TCPH para o tratamento de doenças onco-hematológicas, aparentado, HLA compatível, sem depleção de linfócitos T, assistidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas durante o período de 2008 a 2012. Os pacientes foram submetidos ao transplante alogênico mieloblástico ou não mieloblástico, com células obtidas do sangue periférico ou da medula óssea. Os regimes de condicionamento e a profilaxia da DECH foram selecionadas de acordo com os protocolos existentes no Hospital das Clínicas – UNICAMP. Foram excluídos desse estudo pacientes com doenças não malignas e transplantes alogênicos não aparentados. Foi um estudo prospectivo, conduzido com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas e os pacientes foram incluídos mediante a assinatura do termo de consentimento.

Sangue periférico e isolamento das células mononucleares (CMSP)

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção venosa, por meio do sistema de coleta a vácuo em tubos de 9 mL contendo EDTA. Foram utilizados 200 µL de sangue total para a extração do material genético, por meio do kit comercial de extração de DNA QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA).

Genotipagem KIR/HLA

Amostras de DNA de células progenitoras de pacientes e doadores, dentre os indivíduos selecionados para o transplante, foram disponibilizadas para a genotipagem pelo Laboratório HLA do Hemocentro da UNICAMP. Os genótipos KIR e HLA dos pacientes e doadores foram identificados pela técnica de PCR-SSO reversa (One Lambda Inc.®, Canoga Park, CA, USA) com a tecnologia Luminex. Os *primers* específicos para os locos HLA-A, B, C, DRB1, DQA1 e DQB1 e para os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DS1*, *3DP1* e *2DP1* foram utilizados na amplificação. Os DNAs amplificados foram utilizados para a hibridização com *beads* ligadas a oligonucleotídeos específicos para estes alelos. A hibridização foi verificada por meio de um citômetro de fluxo LABScan™ 100 flow analyzer. A seguir, os dados foram interpretados por meio do programa de computador HLA Visualth (One Lambda, Canoga Park, CA, USA, versão 2.2.0).

Definições

Foi considerada recaída, quando pacientes que estavam em remissão aos 30 dias do pós-transplante voltaram a desenvolver a doença após este período. DECH aguda (DECHa) foi considerada de grau II a grau IV durante os primeiros 100 dias pós-transplante e DECH crônica (DECHc) quando ocorreu após 100 dias pós-transplante. Os pacientes foram acompanhados desde os primeiros dias pós transplante até 5 anos. Os haplótipos KIR dos doadores foram separados em haplótipo A (*KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, *KIR3DL2*) com sete genes e 2 pseudogenes definidos e haplótipo B para aqueles com genes diferentes e números variados do haplótipo A. (Uhrberg et al, 2002). Além disso, para a avaliação dos ligantes KIR-HLA, também foram definidos os grupos de pacientes homocigotos para HLA C1C1 ou C2C2 com a presença dos receptores inibitórios KIR2DL1 e KIR2DL2/3 no doador, e pacientes heterocigotos HLA C1C2 e doadores com os ligantes KIR presentes. Para análise de HLA

Bw4 foram considerados os grupos de pacientes com a presença de Bw4 e doador com KIR3DL1 e os pacientes sem Bw4 e KIR3DL1 presente no doador.

Estatística

Para as variáveis categóricas, foi utilizado o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, a fim de se estabelecer a diferença entre as distribuições. Para as correlações, foram utilizados os testes de Spearman e Pearson's, considerando $R^2 < 20$ como baixa correlação, $20 < R^2 < 40$ como correlação média e $R^2 > 40$ como alta correlação, sempre considerando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o pacote estatístico SPSS para o programa Windows. O nível de significância adotado foi de 5%, Para averiguar a influência da falta dos alelos HLA para os genes *KIR* na ocorrência de DECH aguda e crônica e recaída, foi realizada uma análise univariada de Cox. Os riscos relativos (RR) de complicações foram estimados com relação à genotipagem destes genes e outras variáveis que poderiam estar associadas a elas, como idade e o sexo do paciente e doador, a fonte de células do enxerto (medula óssea ou células progenitoras periféricas) e a situação da doença no momento do transplante. Para as análises de sobrevida global, utilizou-se a curva de Kaplan-Maier considerando o tempo de sobrevida pós-transplante em meses pelo evento de morte. Para as análises de Sobrevida Livre de Evento (SLE), foi considerada sobrevida pós-transplante em meses e o evento foi considerado recaída ou morte por recaída e os pacientes vivos foram censurados.

Resultados

Inicialmente, a análise foi realizada para todo o grupo de pacientes (N=50) e, em seguida, a mesma análise foi feita para o grupo de pacientes com leucemias, uma vez que resultados associados à genotipagem KIR/HLA e transplante são mais expressivos em leucemias. (n=33) (Hsu et al., 2005; Wang et al., 2013). Considerando todos os pacientes, a maioria dos doadores (78%) apresentaram o haplótipo B, enquanto que 22% apresentaram o haplótipo A. Dos pacientes que receberam o haplótipo A do doador, 90% tiveram DECH, aguda ou crônica, comparados com os que receberam o haplótipo B (58%) (dados não estatisticamente significantes). Não houve diferença significativa para recaída entre pacientes que receberam os haplótipo A ou B (27% vs 23%).

Na análise dos pacientes homozigotos e heterozigotos para HLA-, 80% dos pacientes homozigotos tiveram DECH aguda ou crônica, enquanto que para o grupo heterozigoto, 58% dos pacientes tiveram DECH. Também não houve diferença na incidência de recaída entre os grupos homozigotos e heterozigotos (23% vs 25%).

Para os pacientes que apresentaram pelo menos um alelo HLA-Bw4 para o doador com o gene *KIR3DL1* presente, 70% dos pacientes tiveram DECH aguda ou crônica, enquanto que para o grupo dos pacientes com ausência de HLA-Bw4, 60% dos pacientes apresentaram DECH. A incidência de recaída não foi estatisticamente diferente entre os grupos com HLA-Bw4 (70%), e sem HLA-Bw4 (80%) .

Nenhuma diferença significativa foi encontrada na análise de sobrevida global para o grupo com todos os pacientes e para o grupo dos pacientes com leucemias. (Figura 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Houve forte correlação no grupo de pacientes heterozigotos para HLA-C que desenvolveram ou não a DECH aguda com os eventos morte e recaída. Inicialmente, a análise foi feita para todos os pacientes (n=41) e os casos não analisados (n=9) foram os pacientes que morreram antes dos primeiros 100 dias e não tiveram DECH.

Neste grupo, dos 20 pacientes heretozigotos que não desenvolveram DECHa, 18 (90%) estão vivos e 2 (10%) morreram, enquanto que, dos 6 pacientes heterozigotos que desenvolveram DECHa, 4 (66%) morreram ($R^2 = 69\%$, $p = 0,002$). Para a análise dos

eventos morte e recaída, dos 20 pacientes heterozigotos que não tiveram DECHa, 16 (80%) estão vivos sem doença, 4 (20%) recaíram ou morreram por recaída e nenhum morreu por outro motivo. Para os 6 pacientes heterozigotos que desenvolveram a DECHa, 2 (33%) recaíram ou morreram de recaída da doença e 4 (66%) morreram por outras causas que não a recaída ($R^2 = 78\%$, $p < 0,0001$).

Quando a mesma análise foi realizada para os pacientes com leucemias ($n=33$), 6 pacientes não puderam ser analisados, pois morreram antes dos 100 primeiros dias e não desenvolveram DECH. No grupo dos 13 pacientes heterozigotos que não desenvolveram a DECHa, 11 (84%) estão vivos e sem a doença, enquanto que 2 (16%) morreram; dos 4 pacientes heterozigotos que desenvolveram DECHa, 1 (25%) está vivo sem doença e 3 (75%) morreram ($R = 55\%$ $p = 0,02$). Quando os eventos analisados foram morte e recaída, dos 13 pacientes heterozigotos que não desenvolveram DECHa, 11 (84%) estão vivos sem doença e 2 (16%) morreram por recaída, enquanto que, dos 4 pacientes que desenvolveram DECHa, 2 (50%) recaíram ou morreram por recaída da doença e 2 (50%) morreram por outras causas ($R = 82\%$, $p < 0,0001$). A SLE foi maior para os pacientes heterozigotos que não desenvolveram a DECHa, tanto para o grupo das leucemias, quanto para o grupo com todos os pacientes.

Discussão

Os resultados deste trabalho mostraram não haver diferença na sobrevida global entre os grupos de doadores e pacientes (homozigotos e heterozigotos para HLA-C, presença e ausência de HLA-Bw4 e dos haplótipos A e B para os genes KIR). Também não houve diferença quando foram selecionados apenas os pacientes com leucemias.

No entanto, a análise de sobrevida livre de evento, tanto para o grupo dos pacientes com leucemias quanto para todos os pacientes, demonstrou que para o grupo heterozigoto, 84% dos pacientes estão vivos e não desenvolveram DECH aguda, nem recaída ($p < 0,0001$).

Hsu et al.(2005) e Sobecks et al., (2007) demonstraram que existe melhora nas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença em transplantes HLA compatíveis, aparentados, quando existe a falta do ligante HLA no paciente para o receptor KIR inibitório do doador, porém em transplantes com depleção de linfócitos T.

A depleção é o processo de diminuição dos linfócitos T do enxerto. Muitos protocolos de transplante são favoráveis à depleção de T, enquanto outros optam pela não depleção. Este procedimento diminui o desenvolvimento da DECH, mas também diminui o efeito EvL e, portanto, o paciente pode apresentar risco de recaída por conta da presença de células tumorais residuais após o transplante (Bjourklund et al., 2010).

A não depleção de T pode aumentar a incidência da DECH, e proporcionar o efeito EvL. Porém, a alta intensidade da resposta imune provocada pela DECH pode afetar outras células do organismo como a pele e, órgãos internos, o que pode levar o indivíduo à óbito (Yu et al., 2009).

O protocolo de transplante deste estudo não envolveu depleção de linfócitos T e os resultados mostraram não haver diferenças na sobrevida global entre os grupos de doadores e pacientes, baseados na presença dos genes KIR e HLA, sugerindo não haver melhora do resultado do transplante alogênico, aparentado, HLA compatível quando há falta do ligante HLA para o receptor KIR inibitório do doador.

Outros estudos não observaram melhoria da sobrevida global, sobrevida livre de evento, nem proteção à DECH, sugerindo que em transplantes HLA compatível a falta do ligante não faria diferença no resultado do transplante pois as células NK do doador são

transferidas para um ambiente “geneticamente” igual ao de origem e, por isso, mecanismos de tolerância fariam com que as células NK fossem hiporresponsivas (Clausen et al., 2010; Bjourklund et. al., 2010).

Yu et al., (2009) utilizaram células tumorais transfectadas com os diferentes genes *HLA de classe I* co-incubadas com células NK, colhidas do paciente em tempos consecutivos durante o pós-transplante, para mostrar que na ausência da expressão do HLA específico para o KIR inibidor, ocorre degranulação das células NK. A degranulação não foi observada quando as células tumorais foram transfectadas com o ligante HLA específico para o KIR inibitório, mostrando assim que as células NK que emergem durante o período pós-transplante não são hiporresponsivas, como sugerido por Clausen et al.(2010) e Bjourklund et. al., (2010).

Segundo Sobecks et al. (2007), a alorreatividade é possível apenas nos transplantes depletados de linfócitos T. Na presença dos linfócitos T, a maturação das células NK é retardada, enquanto que na ausência dos linfócitos T, a maturação das células NK é mais evidente, favorecendo a alorreatividade nos primeiros meses pós-transplante (Andersson, 2012). Isso explicaria o fato de não termos observado uma melhor resposta no pós-transplante no grupo homozigoto para HLA-C, pois o protocolo de transplante realizado não faz a depleção de linfócitos T.

Kanga et al., (2012), com protocolo não depletado de T e Wang et al., (2013) com protocolo depletado de T, demonstraram que para o grupos nos quais falta um ligante HLA no paciente, para o KIR inibitório do doador (homozigoto C1 ou C2), pode haver uma possível alorreatividade de NK e essa resposta pode promover a destruição de células dentríticas, levando à diminuição do desenvolvimento da DECH. Todavia, nossos resultados mostraram que o grupo que não desenvolveu a DECH aguda e apresentou SLE maior, foi aquele no qual todos os ligantes estavam presentes (heterozigoto C1C2).

Teoricamente, com o desenvolvimento da DECH, também há o efeito EvL e portanto as taxas de recaída são menores. Os nossos resultados mostraram que as taxas de recaída foram menores nos pacientes que não desenvolveram DECH e, por isso, outros mecanismos protetores poderiam estar envolvidos na proteção contra recaída e morte por recaída neste grupo de pacientes.

Muitas outras questões podem interferir na resposta pós-transplante como o tipo de transplante, a fonte de células, o tipo e fase da doença além das particularidades de cada par doador-receptor. Em nosso sistema de estudo, os resultados mostraram que para o grupo heterozigoto (C1C2), a maioria do pacientes não desenvolveu DECH aguda e apresentou maior SLE, sugerindo um possível efeito protetor para esse grupo. Os mesmos resultados não foram significantes para HLA-Bw4 e grupos de haplótiposKIR.

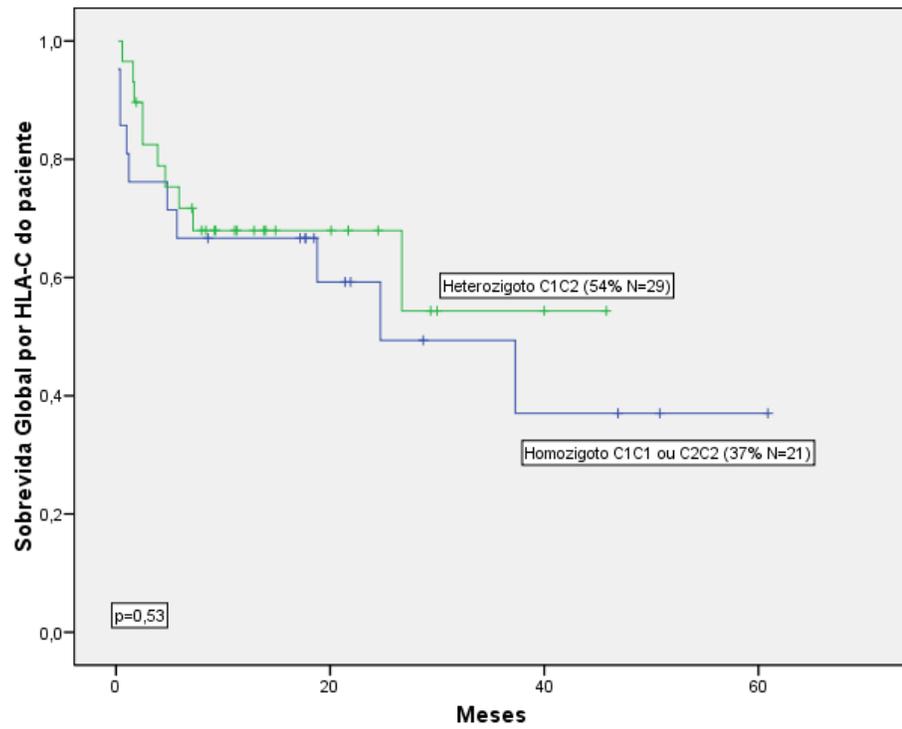


Figura 1. Sobrevida global dos pacientes baseada no grupo HLA-C (C1 ou C2 homozigoto vs C1C2 heterozigoto) (n=50).

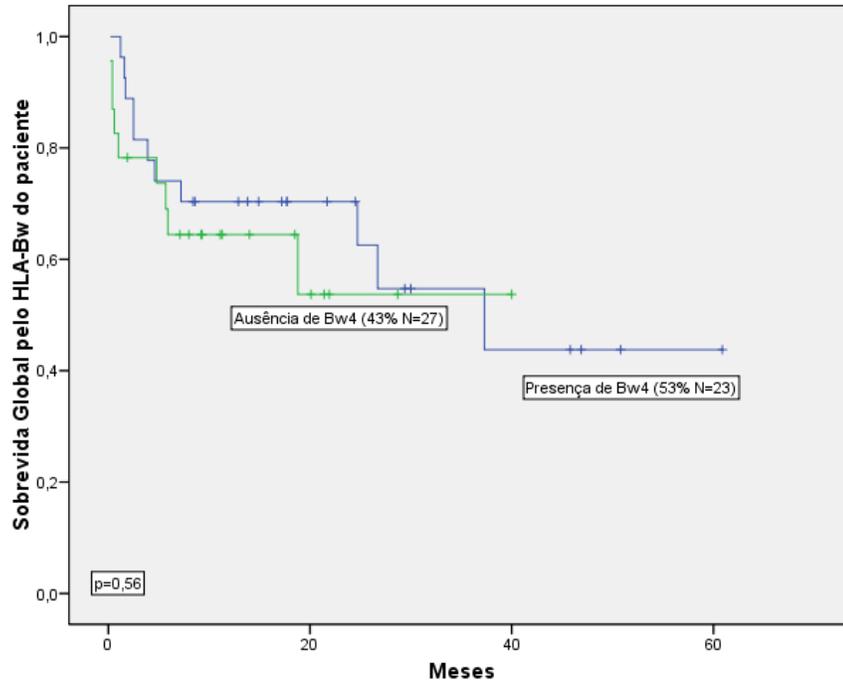


Figura 2. Sobrevida global dos pacientes baseada no grupo HLA-Bw (presença de Bw4 vs ausência de Bw4) (n=50).

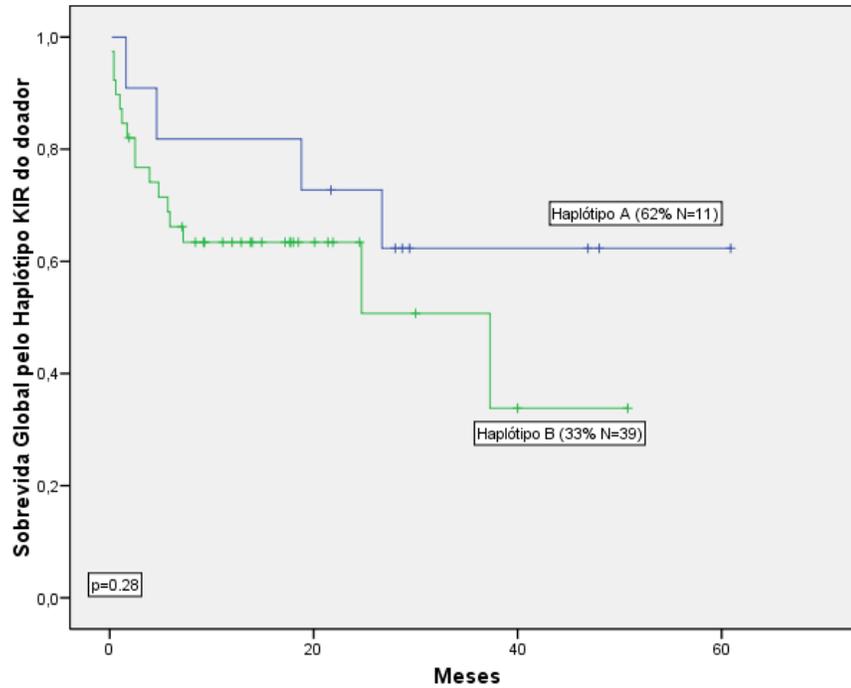


Figura 3. Sobrevida global dos pacientes baseada nos haplótipos A e B dos genes KIR dos doadores (n=50).

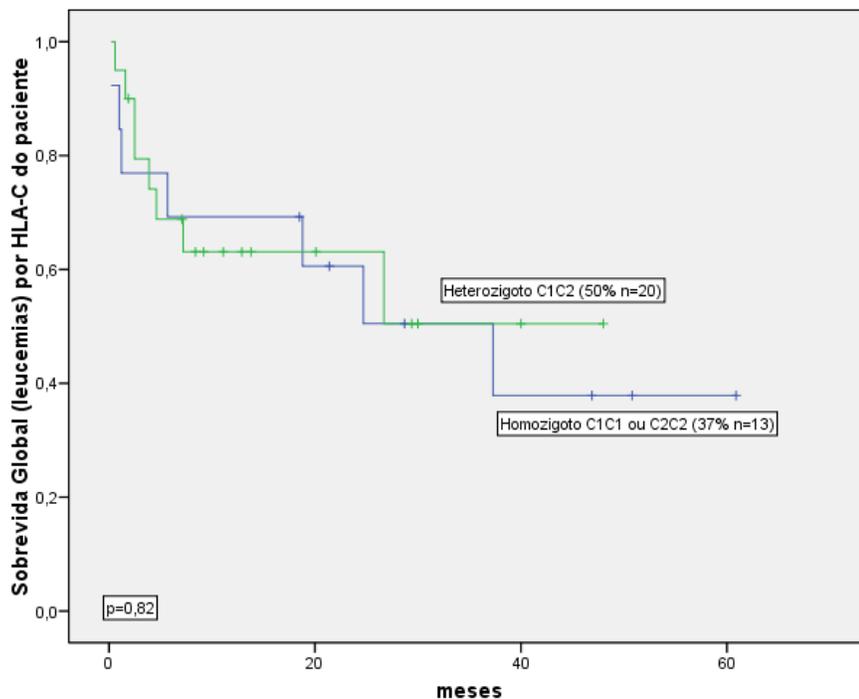


Figura 4. Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseada no grupo HLA-C (C1 ou C2 homozigoto vs C1C2 heterozigoto) (n=33).

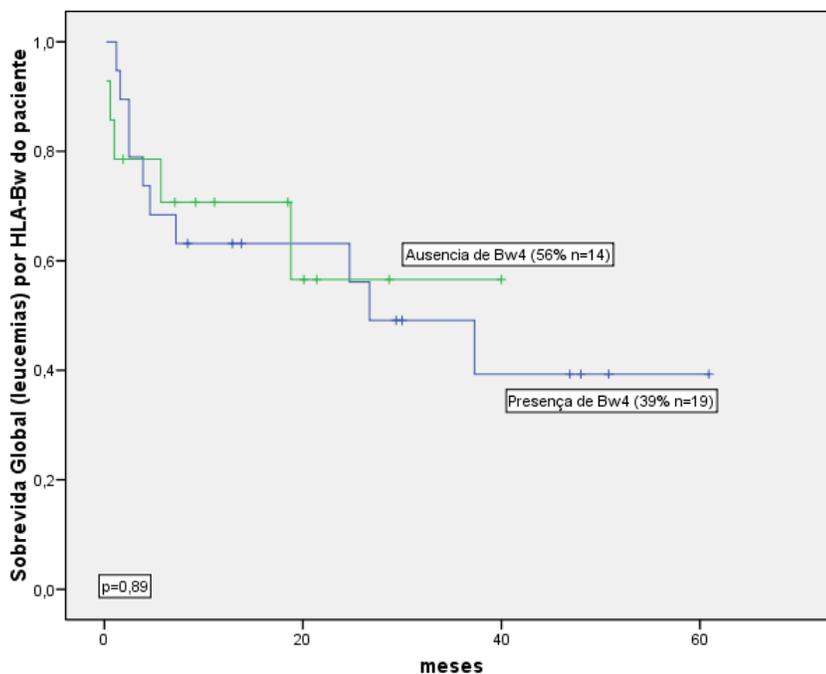


Figura 5. Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseada no grupo HLA-Bw (presença de Bw4 vs ausência de Bw4) (n=33).

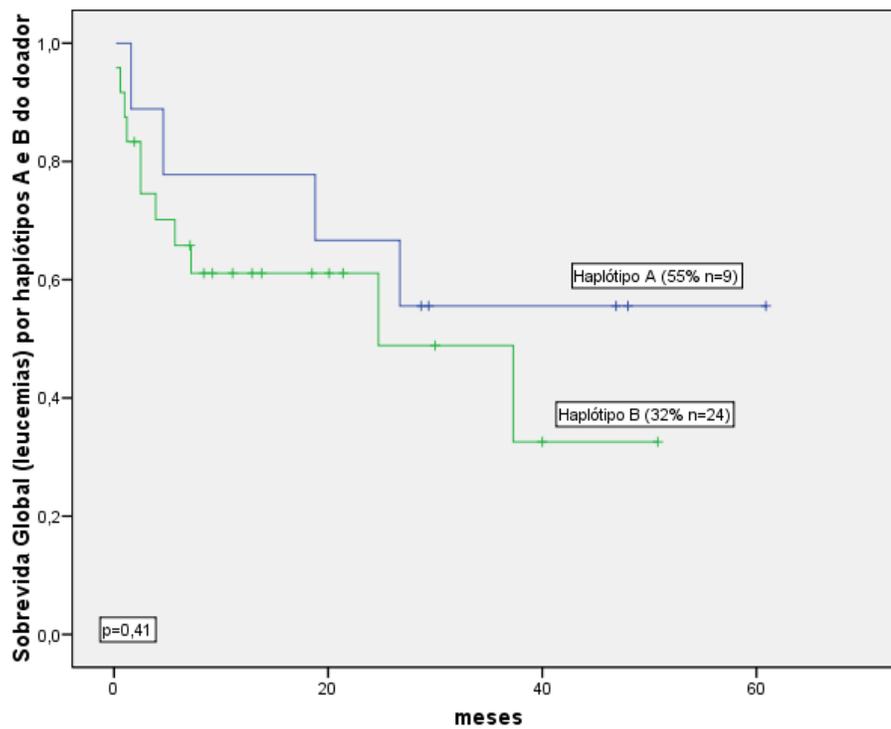


Figura 6. Sobrevida global dos pacientes com leucemias, baseada nos haplótipos A e B dos genes KIR dos doadores (n=33).

Tabela 1. Correlação entre DECH aguda, grupo HLA-C dos pacientes e o evento morte.

Grupo HLA-C do paciente			Presença de DECH aguda		Total
			não	sim	
Homozigoto	Situação final	vivo	6	5	11
		morto	4	0	4
	Total		10	5	15
Heterozigoto	Situação final	vivo	18	1	19
		morto	2	5	7
	Total		20	6	26

R = 69%, p = 0,002.

Tabela 2. Correlação entre DECH aguda, grupos HLA-C dos pacientes e os eventos recaída e morte.

Grupo HLA-C do paciente			Presença de DECH aguda		Total
			não	sim	não
Homozigoto	Evento	vivo	6	5	11
		recaída	3	0	3
		morte por qualquer causa	1	0	1
	Total	10	5	15	
Heterozigoto	Evento	vivo	16	0	16
		recaída	4	2	6
		morte por qualquer causa	0	4	4
	Total	20	6	26	

R = 78%, p < 0,0001.

Tabela 3. Correlação entre DECH aguda, grupo HLA-C dos pacientes com leucemias e o evento e morte.

Grupo HLA-C do paciente			Presença de DECH aguda		Total
			não	sim	não
Homozigoto	Situação final	vivo	5	1	6
		morto	4	0	4
	Total	9	1	10	
Heterozigoto	Situação final	vivo	11	1	12
		morto	2	3	5
	Total	13	4	17	

R = 55%, p = 0,02.

Tabela 4. Correlação entre DECH aguda, grupos HLA-C dos pacientes com leucemias e os eventos recaída e morte.

Grupo HLA-C do paciente			Presença de DECH aguda		Total
			não	sim	não
Homozigoto	Evento	vivo	5	1	6
		recaída	3	0	3
		morte por qualquer causa	1	0	1
	Total	9	1	10	
Heterozigoto	Evento	vivo	11	0	11
		recaída	2	2	4
		morte por qualquer causa	0	2	2
	Total	13	4	17	

R = 82%, p < 0,0001.

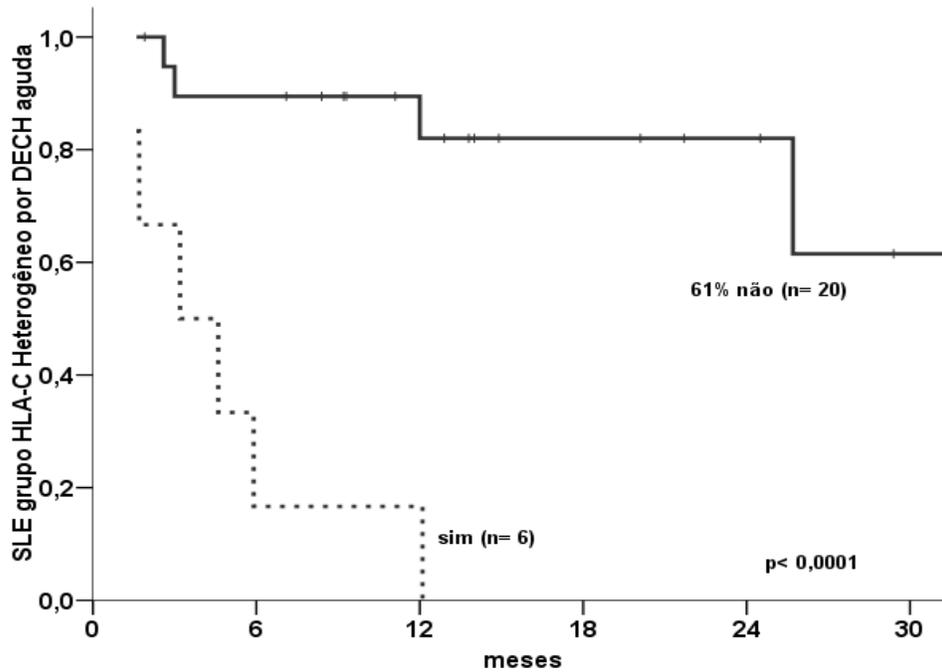


Figura 7. Sobrevida livre de evento do grupo heterozigoto (C1C2) para os pacientes com e sem DECH aguda.

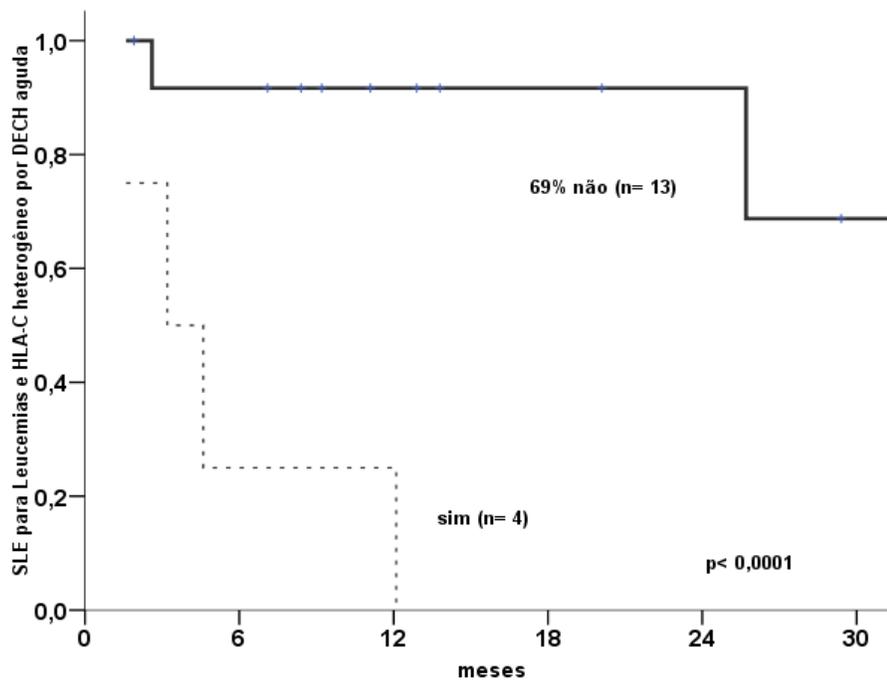


Figura 8. Sobrevida livre de evento do grupo heterozigoto (C1C2) para os pacientes com leucemias, com e sem DECH aguda.

Referências Bibliográficas

Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2369-80. doi: 10.1182/blood-2008-03-143727.

Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:186-201.

Velardi A. Natural killer cell alloreactivity 10 years later. *Curr Opin Hematol*. 2012 Nov;19(6):421-6.

Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998 May 1;101(9):1835-42.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.

Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligandmismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009;113(13):3119-3129.

Hsu KC, Taylor CAK, Wilton A et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukaemia predicted by KIR and HAL genotypes. *Blood* 2005;105:4878-84.

Miller J, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIR ligands is associated with less relapse and increased graft versus host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 2007; 109:5058-5061.

Clausen J, Wolf D, Petzer AL, Gunsilius E, Schumacher P, Kircher B, Gastl G and Nachbaur D. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 111: 1365-2249.

Björklund AT, Schaffer M, Fauriat C, Ringdén O, Remberger R, Hammarstedt C, Barrett AJ, Ljungman P, Ljunggren H. and Malmberg K. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood* 2010 115: 2686-2694.

Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002 Jul;54(4):221-9.

Wang H, He Y, Zhai WJ, Wang M, Zhou Z, Zhao YX, Feng SZ, Han MZ. The impact of recipient HLA-Cw and donor killer immunoglobulin-like receptor genotyping on the outcome of patients receiving HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Swiss Med Wkly*. 2013 Jan 8;143:0.

Sobecks RM, Ball EJ, Maciejewski JP, Rybicki LA, Brown S, Kalaycio M, Pohlman B, Andresen S, Theil KS, Dean R and Bolwell BJ. Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligand groups for killer immunoglobulin-like receptors. *Bone Marrow Transplantation* 2007 39, 417–424.

Yu J, Venstrom JM, Liu X, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, Hsu K. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA

exhibit effector function after T cell–depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009 April 16; 113(16): 3875–3884.

Clausen J, Kircher B, Auberger J, Schumacher P, Ulmer H, Hetzenauer G, Wolf D, Gastl G, Nachbaur D. The Role of Missing Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Ligands in T Cell Replete Peripheral Blood Stem Cell Transplantation from HLA-Identical Siblings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 16: 273-280.

Kanga U, Mourya M, Seth T, George J, Sood P, Sharma R, Saxena A, Mehra NK. Role of killer immunoglobulin-like receptor-ligand interactions in human leukocyte antigen-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2012 May;44(4):919-21.

Anderson S. Formation of the Inhibitory KIR repertoire in Human *Natural Killer* cells. 2012 Karolinska Institutet. Thesis for doctoral degree.

7. Discussão

Estudos de associação e interação de moléculas HLA com outras células têm contribuído para uma melhor compreensão da resposta imunológica pós-transplante. Moléculas HLA de classe I são importantes no controle das funções efectoras das células T citotóxicas e das células *Natural Killer*, enquanto que as moléculas HLA de classe II ativam linfócitos T auxiliares CD4+ (Ljunggren & Karre et al., 1990).

Diferente dos linfócitos T, que reconhecem o antígeno como um fragmento de peptídeo ligado ao HLA, células NK são funcionais na ausência ou diminuição da expressão de proteínas HLA de classe I nas células a serem reconhecidas (Middlenton et al., 2002).

Com isso, nosso grupo investigou, inicialmente, o papel das variantes HLA de classe I e II no desenvolvimento da DECH, em uma população de 176 pacientes submetidos ao transplante alogênico, HLA compatível, com doadores aparentados, e os resultados sugeriram que algumas variantes são determinantes para o desenvolvimento da DECH aguda e crônica.

HLA-A26 (*split* da molécula HLA-A10) foi associado com alto risco de incidência da DECH aguda. Resultados semelhantes foram encontrados em Storb et al. (1983); Weisdorf et al. (1991); Remberger et al. (2002); Adams et al., (2004) e Mohyeddin et al., (2004).

De acordo com Bross et al., (1984), HLA-A19 e B17 foram associados com baixo risco de desenvolver DECH aguda, enquanto que HLA-Cw4, A-11 e B21 mostraram estar associados com alto risco. Nossos resultados foram semelhantes a este estudo, mostrando associação entre HLA-B49 (*split* da molécula HLA-B21) e desenvolvimento de DECH aguda severa. No entanto, HLA-B35 também foi associado com alto risco para DECH aguda severa, em contraste com os achados de Storb et al.(1983) e Ghavamzadeh et al., (2002).

Não foi encontrada neste estudo, nenhuma correlação entre o risco de desenvolver DECH aguda e HLA-A3, A11, HLA-DR1 e DR3, em contraste com os resultados de Clark et al., (2001) e Bross et AL., (1984), respectivamente.

Enquanto que o presente estudo mostrou que HLA-DRB1*15 e DQB1*05 (um dos alelos que apresenta desequilíbrio de ligação com DRB1*15) foram mais frequentes em

pacientes com DECH aguda (grau II a IV), Battiwalla et al. (2006), demonstraram que a ausência de HLA-DR15 representou um fator significativo associado à DECH aguda.

O que explicaria nossos resultados, é a hipótese afirmando a existência de antígenos mieloides imunodominantes, que são preferencialmente apresentados por HLA-DR15, sugerindo que estes alelos têm um importante papel no desenvolvimento da DECH (Battiwalla et al., 2006)

Stern et al., (2006), relataram que o alelo DRB1*15 foi associado à baixa incidência de recaída da doença de base e melhora da sobrevida de pacientes tratados com transplante de células progenitoras hematopoiéticas para leucemia e linfoma não Hodgkin. Porém, não foi observada nenhuma diferença significativa em relação à DECH aguda. No presente trabalho, DRB1*15 parece reduzir o efeito EvL, aumentando a incidência de DECH.

Em relação à incidência de DECH crônica severa, foram encontradas, diferenças estatisticamente significantes. HLA-A9 (A23 ou A24) foi mais frequente nos pacientes com DECH crônica severa, enquanto que HLA-A2 e HLA-B53 foram associados como fatores de proteção, por serem menos frequentes nestes pacientes. HLA-A26 foi associado com DECH crônica severa. HLA-A26 foi mais frequente tanto em pacientes que desenvolveram DECH aguda, quanto em pacientes com DECH crônica severa.

Remberger et al., (2002) relataram uma associação diferente entre a molécula HLA-B27 e o baixo risco de desenvolver DECH crônica. Essas diferenças entre as variantes HLA e as correlações com o risco de desenvolver DECH em diferentes centros de estudo e em diferentes países pode ser explicada por diferenças étnicas entre as populações.

Posteriormente, um estudo prospectivo relacionado com o desenvolvimento da DECH, aguda e crônica, foi conduzido em nosso centro com 50 pares de doador/paciente, em relação às possíveis interações dos genes KIR e HLA com o curso clínico do transplante HLA compatível, aparentado e não depletado de linfócitos T, particularmente, na DECH aguda e crônica, recaída, sobrevida global e sobrevida livre de evento.

Para este estudo, foram definidos os grupos de pacientes homocigotos para HLA C1C1 ou C2C2 com a presença dos receptores inibitórios KIR2DL1 e KIR2DL2/3 no doador, e pacientes heterocigotos HLA C1C2 e doadores com os ligantes KIR presentes.

Para a análise de HLA Bw4, foram considerados os grupos de pacientes com a presença de Bw4 e doador com KIR3DL1 e os pacientes sem Bw4 e KIR3DL1 presente no doador.

Os resultados mostraram não haver diferença na sobrevida global entre os grupos de doadores e pacientes (homozigotos e heterozigotos para HLA-C, presença e ausência para HLA-Bw4 e haplótipo A e B). Também não houve diferença quando foram selecionados apenas os pacientes com leucemias.

No entanto, a análise de sobrevida livre de evento, tanto para o grupo dos pacientes com leucemias quanto para todos os pacientes, demonstrou que para o grupo heterozigoto, 84% dos pacientes sobreviveram e não desenvolveram DECH aguda nem recaída ($p < 0,0001$).

Hsu et al., (2005) e Sobecks et al., (2007) demonstraram que existe melhora nas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença em transplantes HLA compatíveis, aparentados, quando existe a falta do ligante HLA no paciente para o receptor KIR inibitório do doador, porém em transplantes com depleção de linfócitos T.

A depleção é o processo de diminuição dos linfócitos T do enxerto. Muitos protocolos de transplante são favoráveis à depleção de T enquanto que outros optam pela não depleção. Este procedimento diminui o desenvolvimento da DECH, mas também diminui o efeito EvL e, portanto, o paciente pode apresentar risco de recaída por conta da presença de células tumorais residuais após o transplante (Bjourklund et al., 2010).

A não depleção de T pode aumentar a incidência da DECH, e proporcionar o efeito EvL. Porém, a alta intensidade da resposta imune provocada pela DECH pode afetar outras células do organismo como pele, e órgãos internos, podendo levar o indivíduo à óbito (Yu et al., 2009).

O protocolo de transplante deste estudo não inclui depleção de linfócitos T e os resultados mostraram não haver diferenças na sobrevida global entre os grupos de doadores e pacientes, baseado na presença dos genes KIR e HLA, sugerindo não haver melhora do resultado do transplante alogênico, aparentado, HLA compatível quando há falta do ligante HLA para o receptor KIR inibitório do doador.

Outros estudos não observaram melhoria da sobrevida global, sobrevida livre de evento, nem proteção à DECH, sugerindo que em transplantes HLA compatível a falta do

ligante não faria diferença no resultado do transplante pois as células NK do doador são transferidas para um ambiente “geneticamente” igual ao de origem e, por isso, mecanismos de tolerância fariam com que as células NK fossem hiporresponsivas (Clausen et al., 2010; Bjourklund et. al., 2010).

Yu et al., (2009), utilizaram células tumorais transfectadas com os diferentes genes *HLA de classe I* co-incubadas com células NK, colhidas do paciente em tempos consecutivos durante o pós-transplante, para mostrar que na ausência da expressão do HLA específico para o KIR inibidor, ocorre degranulação das células NK. A degranulação não foi observada quando as células tumorais foram transfectadas com o ligante HLA específico para o KIR inibitório mostrando assim que as células NK que emergem durante o período pós-transplante não são hiporresponsivas como sugerido por Clausen et al., (2010) e Bjourklund et. al., (2010).

Segundo Sobecks et al., (2007), a alorreatividade é possível apenas nos transplantes depletados de linfócitos T. Na presença dos linfócitos T, a maturação das células NK é retardada enquanto que na ausência dos linfócitos T, a maturação das células NK é mais evidente o que favorece a alorreatividade nos primeiros meses pós-transplante (Andersson, 2012). Isso explicaria o fato de não termos observado uma melhor resposta no pós-transplante no grupo homozigoto para HLA-C, pois o protocolo de transplante realizado não faz a depleção de linfócitos T.

Kanga et al., (2012) (não depletado de T) e Wang et al., (2013) (depletado de T) demonstraram que para o grupos nos quais falta um ligante HLA no paciente para o KIR inibitório do doador (homozigoto C1 ou C2) pode haver uma possível alorreatividade de NK e essa resposta pode promover a destruição de células dentríticas, levando à diminuição do desenvolvimento da DECH. Todavia, nossos resultados mostraram que o grupo que apresentou menor desenvolvimento da DECH aguda e menores taxas de recaída foi aquele no qual todos os ligantes estavam presentes (heterozigoto C1C2).

Teoricamente, com o desenvolvimento da DECH, também há o efeito EvL e, portanto, as taxas de recaída são menores. Os nossos resultados mostraram que as taxas de recaída foram menores nos pacientes que não desenvolveram DECH e, por isso, outros

mecanismos protetores poderiam estar envolvidos na proteção contra recaída e morte por recaída neste grupo de pacientes.

Muitas outras questões podem interferir na resposta pós-transplante, como o tipo de transplante, a fonte de células, o tipo e fase da doença além das particularidades de cada par doador-receptor. Em nosso sistema de estudo, os resultados mostraram que para o grupo heterozigoto (C1C2) houve diminuição das taxas de recaída e morte por recaída, diminuição na incidência de DECH aguda e, portanto, aumento da sobrevida livre de evento, sugerindo um possível efeito protetor para esse grupo. Os mesmos resultados não foram significantes para HLA-Bw4 e grupos de haplótipos KIR.

8. Conclusões

Os resultados do presente estudo mostraram que:As variantes HLA podem influenciar na ocorrência de DECH em transplante alogênico, com doadores relacionados, HLA-idênticos, tanto como fatores de proteção, quanto como fatores de susceptibilidade .

A interação KIR/HLA tem impacto significativo no resultado dos transplantes relacionados, HLA compatível, sem depleção de linfócitos T, influenciando na incidência de recaída e na ocorrência da DECH. Para o grupo heterozigoto (C1C2), a maioria do pacientes não desenvolveu DECH aguda e apresentou maior SLE, sugerindo um possível efeito protetor para esse grupo.

9. Referências Bibliográficas

Abbas A. K and Lichtman A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. 2005.

Lee SJ, Klein J, Haagenson M et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; 110:4576-83.

Charon D. HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine. *Vox Sanguinis*, 2011; 100: 163-6.

Dausset J. An interview with Jean Dausset. *Am J Transplant* 2004 Jan; 4(1): 4-7.

Jawdat D, Al Saleh S, Sutton P, Al Anazi H, Shubaili A, Uyar FA, et al. HLA-C Polymorphisms in two cohorts of donors of bone marrow transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*.2012;23:467-70.

Klein J and Sato A. The HLA system. *The New Engl Jour of Med*. 2000;343: 702-709.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004 Dec;5(12):889-99.

Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and tumors. *J Immunotoxicol* 2008 Oct; 5(4): 361-367.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J Immunol* 2005;174:6-9

Strominger JL. Human histocompatibility proteins. *Immunol Rev* 2002 Jul; 185:69-77.

Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003 Oct 47;1.

Marry E. Genetics diversity and bone marrow transplantation. *Bull Soc Pathol Exot.* 2012 May;105(2):137-42

Storb R, Prentice RL, Hansen JA, Thomas ED. Association between HLA-B antigens and acute graft-versus-host disease. *Lancet.* 1983;2(8354):816-9.

Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation.* 1991;51(6):1197-203.

Remberger M, Persson U, Hauzenberger D, Ringdén O. An association between human leucocyte antigen alleles and acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2002;119(3):751-9.

Mohyeddin Bonab M, Alimoghaddam K, Vatandoust S, et al. Are HLA antigens a risk factor for acute GVHD in thalassemic patients receiving HLA-identical stem cell transplantation? *Transplant Proc.* 2004;36(10):3190-3.

Adams KM, Holmberg LA, Leisenring W, et al. Risk factors for syngeneic graft-versus-host disease after adult hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2004;104(6):1894-7.

Ljunggren HG, Karre K. In search of the missing self: MHC molecules and NK recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244.

Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:186-201.

Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, Anderson S, Bjorklund A, Bjorkstrom NK, Baumann BC, Fauriat C, Alici E, Dilber M and Ljunggren HG. NK cells-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 57, 1541-1552.

Desbóis M, Rusaliewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N. Natural Killer cells in non-hematopoietic malignances. *Frontiers in immunology*. 2012; 395: 1-12.

Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975 Aug 15; 16(2): 230-239.

Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. Natural Killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975 Feb; 5(2): 112-117.

Karre K. Natural Killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 2008 May; 9(5):477-480.

Karre K. On the immunobiology of Natural Killer cells. Doctoral thesis, Karolinska Institutet 1981.

Karre K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of Natural Killer activity: a reevaluation and a hypothesis. *Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells* (eds. Callewaert, D. & Herberman, R.B.). Academic, San Diego, 1985 1985:81-91.

Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly49+ IL-2 activated killer cells. *Nature* 1992 Jul 2; 358(6381): 66-70

Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene family encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:613-635.

Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et. al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995 Sep 1;182(3): 875-884.

EMBL-EBI database. : <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, acessado em 20 de janeiro de 2013.

Moretta L, Moretta A, Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Embo J* 2004 Jan 28; 23(2): 255-259.

Bryceson YT, Long EO. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* 2008 Jun; 20(3): 344-352.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274.

Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7: 277-300

Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000 Apr; 51(4-5): 268-280.

Andersson S, Fauriat C, Malmberg JA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood* 2009 Mar 20.

Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rael and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001 Sep 25; 98(20):11521-11526.

Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2006 Feb 20; 203(2): 289-295.

Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997 Dec 1; 186(11): 1809-1818.

Butcher S, Arney KL, Cook GP. MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells. *Eur J Immunol* 1998 Nov; 28(11): 3755-3762.

Parham P. MHC class I molecules and KIR in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005 Mar; 201-214.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223.

Cosman D, Mulberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulated NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001 Feb; 14(2): 123-133.

Poggi A, Zocchi MR. Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self-aggression. *Autoimmun Rev* 2007 Apr; 6(5): 295-299.

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008 Apr; 28(4): 571-580.

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006 Jan 1; 107(1): 159-166.

Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* 2008 Dec 22; 205(13): 2959-2964.

Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008 Sep; 8(9): 713-725.

Davis DM. Mechanisms and functions for the duration of intracellular contacts made by lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2009 Aug; 9(8): 543-555.

Culley FJ, Johnson M, Evans JH, Kumar S, Crilly R, Casasbuenas J, et al. Natural killer cell signal integration balances synapse symmetry and migration. *PloS Biol* 2009 jul; 7(7): e1000159.

Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells – enhancement by therapeutic antibodies. *PloS ONE* 2007; 2(3): e326.

Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms onduced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009 Feb; 6(1): 15-25.

Pan G, ORourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997 Apr 4: 276(5309): 111-113.

Moulian N, Berrih-Aknin S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymicand pheripheral aspects. *Semin immunol* 1998 Dec; 10(6): 449-456.

Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* 2007 Jun; 19(3): 339-347.

Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. 3^a edição 2008 São Paulo: BBS Editora

McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med*. 2005 Oct;11(10):1026-8.

Astigarraga CC. Caracterização das células Natural Killer no processo de reconstituição imune precoce pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas e sua influência na pwga e no desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). 2006 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Tese de Mestrado

Silva MM, Bouzas LFS, Filgueira AL. Manifestações tegumentares da doença do enxerto contra o hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea. *An. Bras. Dermatol*. 2005 Jan;80 (1).

Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for hematopoietic transplants. *Nat Rev. Immunol*. 2003 3:108-122.

Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2369-80. doi: 10.1182/blood-2008-03-143727.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.

Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, Bornhäuser M, Christiansen F, Gratwohl A, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, van Rood JJ, Petersdorf E KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Aug;12(8):828-36.

Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998 May 1;101(9):1835-42.

Lazarus HM, Vogelsang GB, Rowe JM. Prevention and treatment of acute graft-versus-host disease: the old and the new. A report from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). *Bone Marrow Transplant*. 1997 Mar;19(6):577-600.

Mutis T, Goulmy E. Hematopoietic system-specific antigens as targets for cellular immunotherapy of hematological malignancies. *Semin Hematol*. 2002 Jan;39(1):23-31.

Silva MR, Parreira A, Ascensão JL. Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: conditions for in vitro expansion. *Exp Hematol*. 1995 Dec;23(14):1676-81.

Moretta L, Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Natural killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias. *Tissue Antigens*. 2010 Feb;75(2):103-9. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01404

Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligandmismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009;113(13):3119-3129.

Miller J, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIRligands is associated with less relapse and increased graft versus host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 2007; 109:5058-5061.

Yu J, Venstrom JM, Liu X, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, Hsu K. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009 April 16; 113(16): 3875–3884.

Björklund AT, Schaffer M, Fauriat C, Ringdén O, Remberger R, Hammarstedt C, Barrett AJ, Ljungman P, Ljunggren H. and Malmberg K. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood* 2010 115: 2686-2694.

Hsu KC, Taylor CAK, Wilton A et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukaemia predicted by KIR and HAL genotypes. *Blood* 2005;105:4878-84.

Anderson S. Formation of the Inhibitory KIR repertorie in Human *Natural Killer* cells. 2012 Karolinska Institutet. Thesis for dostoral degree.

Sobecks RM, Ball EJ, Maciejewski IJP, Rybicki LA, Brown S, Kalaycio M, Pohlman B, Andresen S, Theil KS, Dean R and Bolwell BJ. Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligandgroups for killer immunoglobulin-like receptors. *Bone Marrow Transplantation* 2007 39, 417–424.

Linn YC, Phang CY, Lim TJ, Chong SF, Heng KK, Lee JJ, Loh Y, Hwang W, Goh YT and Koh M. Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients

undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients *Bone Marrow Transplantation* 2010 45, 1031–1037

Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):517-25.

Charron D. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):493-7.

Stern M, Passweg J, Tiercy JM, et al. Human leukocyte antigen DR15 is associated with reduced relapse rate and improved survival after human leukocyte antigen-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(11):1169-75.

Petersdorf EW, Malkki M. Genetics of risk factors for graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* 2006;43(1):11-23.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295-304.

Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, et al. Consensus among bone marrow transplanters for diagnosis, grading and treatment of chronic graft-versus-host disease. Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(3):247-54.

Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31(11):1044-50.

Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(12):1145-51.

Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003;349(23):2201-10.

Visentainer JEL, Sell AM, Franceschi DA, Lieber SR, Souza CA. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas [Importance of regulatory cytokine gene polymorphisms in hematopoietic stem cell transplantation]. *RBCF Rev Bras Ciênc Farm (Impr).* 2008;44(4):739-48.

Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Behrouzan O, et al. HLA and risk of acute graft versus host disease in allogenic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Arch Irn Med.* 2002;5(1):16-20. Available from: <http://www.ams.ac.ir/AIM/0251/aim025116.htm>. Accessed in 2011 (Nov 22).

Clark RE, Hermans J, Madrigal A, et al. HLA-A3 increases and HLA-DR1 decreases the risk of acute graft-versus-host disease after HLA-matched sibling bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;114(1):36-41.

Bross DS, Tutschka PJ, Farmer ER, et al. Predictive factors for acute graft-versus-host disease in patients transplanted with HLA-identical bone marrow. *Blood.* 1984;63(6):1265-70.

Battiwalla M, Hahn T, Radovic M, et al. Human leukocyte antigen (HLA) DR15 is associated with reduced incidence of acute GVHD in HLA-matched allogeneic transplantation but does not impact chronic GVHD incidence. *Blood.* 2006;107(5):1970-3.

Kanga U, Mourya M, Seth T, George J, Sood P, Sharma R, Saxena A, Mehra NK. Role of killer immunoglobulin-like receptor-ligand interactions in human leukocyte antigen-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2012 May;44(4):919-21.

Wang H, He Y, Zhai WJ, Wang M, Zhou Z, Zhao YX, Feng SZ, Han MZ. The impact of recipient HLA-Cw and donor killer immunoglobulin-like receptor genotyping on

the outcome of patients receiving HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies. *Swiss Med Wkly.* 2013 Jan 8;143:0

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(14):6259-63.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285(5428):727-9.

Bettens F, Passweg J, Gratwohl A et al. Association of TNF α and IL-10 polymorphisms with mortality in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 1261-7.

Butcher S, Arney KL, Cook GP. MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells. *Eur J Immunol* 1998 Nov; 28(11): 3755-3762.

Carlsen M. Molecular Specificities of NK cell-mediated recognition of human tumor cells. Thesis for doctoral degree. 2010. Karolinska Institutet.

Franceschi DSA, Sell AM, Aranha FJP, Souza CA, Cardozo DM, Visentainer JEL. Importancia de receptores KIR no transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas. *Rev Bras Hemat Hemot* 2010.

Hue S, Monteiro RC, Berrih-Aknin S, Caillat-Zucman S. Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J Immunol* 2003;171(4):1909-17.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et. al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3⁻ CD16⁺ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytotoxic function. *J Exp Med* 1990 Mar 1; 171(3): 695-714.

Mullighan C, Heatley S, Doherty K et al. Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004;77:587-96.

Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94:333-9.

Storkus, WJ, Alexander J, Payne JA et al. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2361.

J. Clausen, D. Wolf, A. L. Petzer, E. Gunsilius, P. Schumacher, B. Kircher, G. Gastl and D. Nachbaur. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 111: 1365-2249.

Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002 Jul;54(4):221-9

Clausen J, Kircher B, Auberger J, Schumacher P, Ulmer H, Hetzenauer G, Wolf D, Gastl G, Nachbaur D. The Role of Missing Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Ligands in T Cell Replete Peripheral Blood Stem Cell Transplantation from HLA-Identical Siblings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 16: 273-280.

10. Anexos

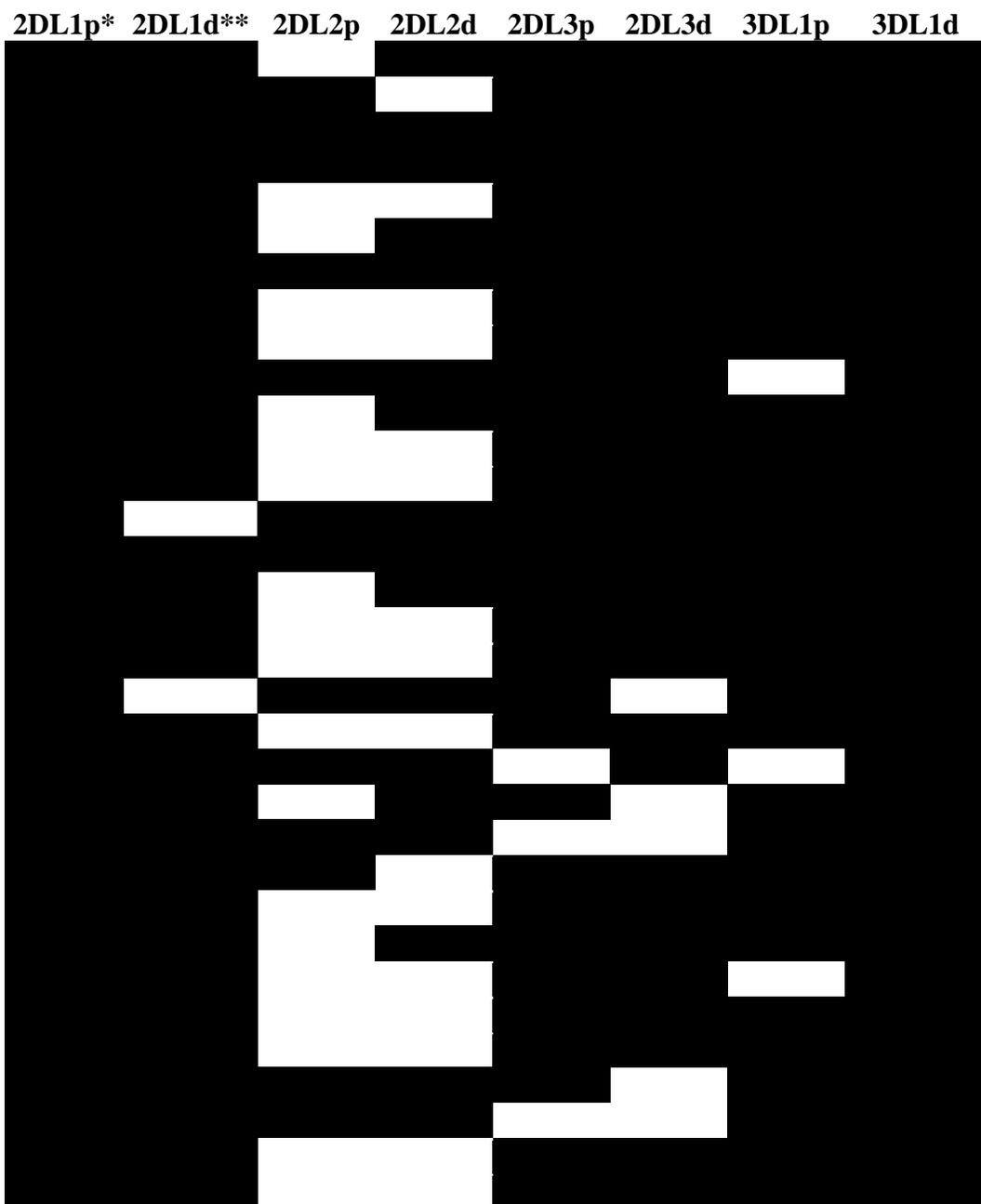
10.1 Anexo I **Capítulo II**

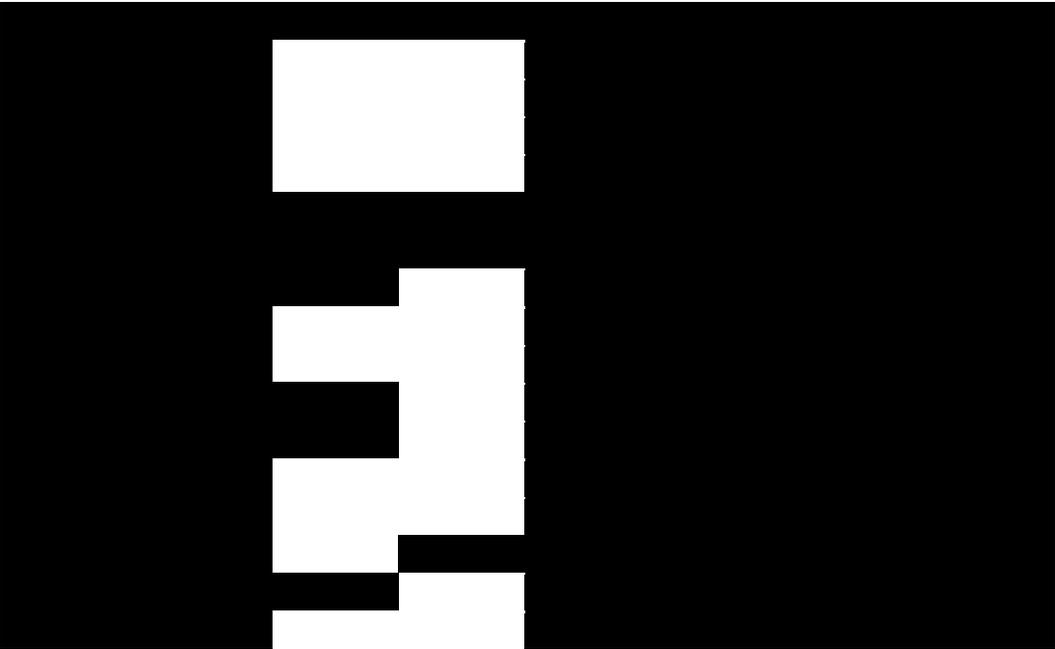
Tabela 1. Informações dos pacientes pelo grupo HLA-C no TCPH

Variáveis	HLA-C paciente		valor de p
	Homogêneo n= 21	Heterogêneo n= 29	
Doador F e paciente M	02	04	0,99
Idade do paciente (mediana/variação)	44 (31-68)	41 (21-69)	0,26
Idade do doador (mediana/variação)	42 (26-72)	44 (12-69)	0,81
Tempo entre Dx e TCPH	5 (1-96)	7 (1-68)	0,75
Tipo de TCPH: mieloablativo	11	21	0,23
Não Mieloablativo	10	08	
Situaçãoda doença ao TCPH:			0,38
Precoce	07	14	
Avançado	14	15	
Condionamento: Bu + CY	06	16	0,28
Bu + CY + VP	02	03	
Bu + Fludara	03	05	
Fludara + Melfalan	05	03	
Fludara + ICT	04	02	
ICT + CY + VP	01	00	
Fonte de células: Medula	03	10	0,19
Sangue periférico	18	19	
Profilaxia da DECH: CsA + MTX	18	26	0,68
CsA + MMF	03	03	
Dias de internação (mediana/variação)	23 (7-133)	22 (14-49)	0,76
Pega de Granulócitos (mediana/variação)	16 (9-22)	17 (11-26)	0,12
Pega de Plaquetas (mediana/variação)	17 (10-29)	19 (10-35)	0,21
Células nucleadas infundidas	5,45 (1,73-22,3)	4,46 (1,41-12,7)	0,16
Células CD34+ infundidas	5,67 (1,14-11,3)	4,18 (1,0-18,9)	0,71
Se DECH aguda	01	06	0,32
Se DECH crônica	08	07	0,32

Se recaída	04	07	0,99
Se óbito	10	10	0,39
Tempo de seguimento	17 (0-61)	9 (1-46)	0,17

Figura 1. Distribuição dos genes KIR em pacientes e doadores





*Pacientes **Doadores