



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

LÍGIA BEATRIZ CHAVES ESPINOSO SCHTRUK

CORRELAÇÃO ENTRE INCOMPATIBILIDADE HLA E REJEIÇÃO NOS
TRANSPLANTES CARDÍACOS REALIZADOS NO INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA

RIO DE JANEIRO

2014

LÍGIA BEATRIZ CHAVES ESPINOSO SCHTRUK

CORRELAÇÃO ENTRE INCOMPATIBILIDADE HLA E REJEIÇÃO NOS
TRANSPLANTES CARDÍACOS REALIZADOS NO INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA

Dissertação submetida ao Corpo Docente do programa de Mestrado Profissional em Ciências Cardiovasculares, área de concentração em Ciências Cardiológicas, Linha de pesquisa em Insuficiência Cardíaca e Transplante, do Instituto Nacional de Cardiologia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Cardiovasculares

Orientador(es): Prof.^a Tereza Cristina Felipe Guimarães
Prof. Luís Cristóvão Porto

RIO DE JANEIRO

2014

S396c Schtruk,Lígia Beatriz Chaves.

Correlação entre incompatibilidade HLAe rejeição nos transplantes cardíacos realizados no Intituto Nacional de Cardiologia / Lígia beatriz Chaves Schtruk – Rio de Janeiro, 2014.

62 f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia – INC

1. Transplante cardíaco. 2. Incompatibilidade HLA.
3. HLA 4. Rejeição I. Título.

INC/MS

CDU – 616.005

Correlação entre incompatibilidade HLA e rejeição nos transplantes cardíacos
realizados no Instituto Nacional de Cardiologia.

Lígia Beatriz Chaves Espinoso Schtruk

Orientadores:

Prof.^a Tereza Cristina Felipe Guimarães

Prof. Luís Cristóvão Porto

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Mestrado Profissional em Ciências Cardiovasculares, área de concentração em Ciências Cardiológicas, Linha de pesquisa em Insuficiência Cardíaca e Transplante, do Instituto Nacional de Cardiologia, Como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Cardiovasculares.

Aprovado em 22 de dezembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Maria Cristina Caetano Kuschnir

Prof. Dr. Alexandre siciliano Colafranceschi

Prof. Dr. Paulo Moreira da silva Filho

Rio de Janeiro, RJ

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilton e Valquíria, exemplo de honestidade, trabalho e dedicação, pelo apoio incondicional que me permitiu chegar até aqui. Obrigada por terem me ensinado a importância e o valor do conhecimento e do aprendizado.

À minha Vó Lota (*in memoriam*), pelo exemplo de serenidade e paciência, que me fizeram ser capaz de manter a tranquilidade e prosseguir nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Marcus e Júlio (*in memoriam*), parceiros nas horas e horas dedicadas ao estudo da medicina. Perto ou longe, sempre juntos.

Às minhas filhas, Isadora e Bárbara, pelo carinho e amor que justificam minha existência. Peço-vos desculpas pelas ausências, que pretendo compensar com muita corujice.

Ao meu esposo, Daniel, por entender a importância desse projeto em minha vida, estar sempre ao meu lado, apoiando-me e implorando para que eu saísse de perto do computador.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, que desde o primeiro momento confiaram e se colocaram à disposição para participar deste estudo, meu muito obrigado.

A enfermeira, Profa. Dra. Tereza Cristina Felipe Guimarães, pelo incentivo para o meu engajamento neste projeto, o que permitiu que eu realizasse um sonho que estava adormecido. Obrigada pela amizade, apoio e orientação.

Ao Prof. Luis Cristóvão Pôrto por ter me apoiado este estudo desde o início, contribuindo com o seu conhecimento e abrindo-me as portas do laboratório para que o projeto se tornasse realidade.

Ao Dr Alexandre Siciliano Colafranceschi, pelo incentivo à inovação e ao aprimoramento contínuo, sempre em busca do conhecimento para melhoria na assistência aos pacientes.

À Prof. Dra. Maria Cristina Kuschnir pelas sugestões e correções sempre objetivas e pertinentes.

À Equipe do Laboratório de HLA de UERJ, em particular Juliana Pessanha Rodrigues Motta e Gabriel Milson Fabrício da Silva, pela boa vontade, competência e dedicação, não só na realização dos exames, como na descrição das técnicas laboratoriais.

À equipe do Laboratório de Imunogenética do HEMORIO, particularmente à Dra. Shirley Castilho, Gloria da Conceição Barbosa e Roberta Alves Maia, sempre dispostas a ajudar, disponibilizando resultados de maneira ágil e precisa, reunindo informações fundamentais para nossa análise.

Aos amigos do Serviço de Insuficiência Cardíaca e Transplante do INC, obrigada pelo apoio, incentivo e pelo cuidado com nossos pacientes.

A GEX-NORTE / INSS, SST e APS Ilha do Governador, representados pelo Sr Alexandre Maia de Carvalho, Dra. Carla Torres Schmidt, Sr. Fabiano R. Maia e Sra. Denise Zappeli, por terem compreendido a importância do Mestrado Profissional para minha formação médica. Sem o apoio dos Senhores, isso não seria possível.

Às amigas e companheiras de luta, Andrea Trindade Menezes, Cinthia Pedrozo, Denise Ginzburg, Lídia Nascimento Corrêa, Mariana Dottori, Rosane Inecco e Sandra Sá, pelo incentivo, apoio e ajuda que permitiram a realização do mestrado sem que eu me descuidasse do dia a dia de trabalho.

A Marcio Nunes de Paula, pela paciência em discutir e elaborar a análise estatística.

Luiz Andrade Santos e Laís Castro, que com dedicação, persistência e paciência me ajudaram a resolver todos os trâmites burocráticos.

À Margarida de Fátima Francisco, por ajudar a cuidar das minhas meninas, deixando-me tranquila e segura para me dedicar aos estudos.

Ao nosso Deus, fonte de luz que ilumina nossa vida e sem o qual nada é possível...

*Desistir... eu já pensei seriamente nisso,
mas nunca me levei realmente a sério; é
que tem mais chão nos meus olhos
do que o cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos,
do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração
do que medo na minha cabeça.”*

CORA CORALINA

RESUMO

Introdução: O presente estudo tem como objetivo principal correlacionar o número de incompatibilidades HLA com a frequência de rejeição celular aguda, nos primeiros seis meses após o transplante cardíaco. O objetivo secundário é detectar a presença de anticorpos *neoformados* pelo receptor, tanto para antígenos HLA, quanto não-HLA (MICA).

Métodos: estudo de Coorte. A população foi composta por todos os pacientes adultos transplantados no Instituto Nacional de Cardiologia (INC) no período de 01/01/2008 e 31/12/2013, excluídos os receptores ou doadores sem HLA determinado. Do total de 39 transplantes foram incluídos 25 pacientes e seus respectivos doadores, realizada pesquisa de *neoanticorpos* por citometria de fluxo em 21 receptores (quatro haviam falecido na ocasião do estudo). Determinado os *loci*: HLA-A, HLA-B e HLA DR do doador e do receptor pela metodologia de PCR-RSSO. Classificados em 6 grupos, de acordo com o número de incompatibilidades entre alelos HLA. Pesquisa de anticorpos *neoformados* por citometria de fluxo e imunofluorescência. Biópsias endomiocárdicas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e coloração especial de tricrômio de Gomori, analisadas e classificadas de acordo com os achados histológicos definidos pela International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).

Resultados: Não houve correlação significativa entre o número de incompatibilidades e a frequência de rejeição celular aguda nos primeiros seis meses após o transplante, quando analisado o número de incompatibilidades HLA de maneira global ($p:0,350$). Ao analisarmos separadamente a incompatibilidade no locus HLA-DR, encontramos uma frequência de rejeição significativamente maior ($p:0,054$). Não houve interferência dos outros fatores analisados: idade, raça, tipagem sanguínea, sexo (doador x receptor), causa do óbito do doador, viremia por CMV, presença de *neoanticorpos* anti-HLA e MICA.

Conclusão: Foi encontrada correlação significativa entre incompatibilidade HLA-DR e maior número de episódios de rejeição celular aguda nos primeiros 6 meses após transplante cardíaco. Em quatro dos 21 receptores analisados foi detectada presença de *neoanticorpos*, todos sem evidência de rejeição confirmada por biópsia endomiocárdica.

Palavras-chave: Transplante cardíaco. Rejeição. HLA. Incompatibilidade HLA.

ABSTRACT

Introduction: This study aims to correlate the number of HLA mismatches with the frequency of acute cellular rejection in the first six months after heart transplantation. The secondary objective is to detect in the receptor the presence of *neo*-antibodies against antigens HLA and non-HLA (MICA).

Methods: Cohort study. The population consisted of all adult patients transplanted at the National Institute of Cardiology (INC) between 01/01/2008 and 31/12/2013, excluding receptors or donors without definition of HLA. Of the 39 transplants were included 25 patients and their donors, performed neo-antibodies by flow cytometry on 21 receptors (4 had died at the time of the study). Found loci: HLA-A, HLA-B and HLA DR donor and recipient RSSO by PCR-methodology. Classified into six groups according to the number of HLA incompatibilities. Research neo-formed antibodies were by flow cytometry and immunofluorescence. Endomyocardial biopsies stained with hematoxylin-eosin technique and special staining Gomori's trichrome, analyzed and classified according to the histological findings defined by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).

Results: There was no significant correlation between the number of incompatibilities and the frequency of acute cellular rejection in the first 6 months after transplantation when analyzing the number of HLA mismatches globally ($p: 0.350$). When analyze separately the mismatch in HLA-DR locus, we found a significantly higher rejection rate ($p: 0.054$). There was no interference from the other factors analyzed: age, race, blood type, sex (donor x receiver), cause of the donor's death, CMV viremia, the presence of neo- antibodies anti-HLA and anti-MICA.

Conclusion: We found a significant correlation between HLA-DR mismatch and greater number of episodes of acute cellular rejection in the first 6 months after heart transplantation. In 4 of the 21 analyzed receptors was detected presence of neo-antibodies, all without evidence of rejection confirmed by endomyocardial biopsy.

Keywords: Heart transplantation. Rejection. HLA. HLA mismatching.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Nomenclatura HLA.....	21
Figura 2 – Polimorfismo dos genes HLA descritos até 2013. Robinson J et al. Nucl. Acids Res. 2013;41:D1222-D1227	22
Figura 3 – Estrutura do cromossomo 6	27
Figura 4 estrutura molecular das moléculas HLA Classe I e Classe II	28
Figura 5 – Grau 0R: BEM normal, sem evidência de infiltrado celular (H&E.....	37
Figura 6 – Grau 1R: presença de infiltrado perivascular e intersticial sem evidência clara de dano do miócito (H&E.....	37
Figura 7 – Grau 2 R: visão em alta resolução de um foco de lesão com infiltrado Inflamatório e dano do miócito, com alteração da arquitetura tecidual (H&E)	37
Figura 8 – 3 R: dano difuso com infiltrado inflamatório intenso e ...áreas de necrose tecidual, perda da arquitetura tecidual habitual (H&E)	37
Figura 9 Pacientes incluídos no estudo.....	40
Figura 10 - Resultado histopatológico das biópsias endomiocárdicas segundo a classificação ISHLT	45
Figura 11 Gráfico com intervalo de tempo entre o transplante e o diagnostico de RCA (rejeição celular aguda) classificada como 2R pela ISHLT	45
Tabela 1– Classificação de gravidade da insuficiência cardíaca pela NYHA.....	19
Tabela 2 – Tabela de pontuação para fins de classificação pelo número de incompatibilidades no sistema HLA na seleção de receptores em transplante renal	29
Tabela 3 – classificação histológica de biópsias endomiocárdicas pela International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).....	36
Tabela 4 – Dados demográficos dos doadores e receptores	41
Tabela 5 – Doença de base dos receptores.....	41
Tabela 6 – Causa do óbito do doador	42
Tabela 7 – Características dos receptores excluídos da amostra	43
Tabela 8 – Esquema imunossupressor utilizado	44
Tabela 9 – Características dos pacientes que apresentaram <i>neo</i> -anticorpos após realização do transplante.....	46

Tabela 10 – Número de incompatibilidades HLA entre doadores e receptores ...	47
Tabela 11 – Significância segundo o Teste Qui-Quadrado das variáveis analisadas em relação às características gerais da amostra	48
Tabela 12 – Significância segundo o Teste Qui-Quadrado das variáveis analisadas com relação à incompatibilidade HLA	49
Tabela 13 – Significância segundo o Teste Qui-Quadrado das variáveis analisadas com relação à presença de <i>neo</i> -anticorpos	49

LISTA DE ABREVIACÕES

0R	Biópsia endomiocárdica sem sinais de rejeição celular
1R	Biópsia endomiocárdica com rejeição celular leve
2R	Biópsia endomiocárdica com rejeição celular moderada
3R	Biópsia endomiocárdica com rejeição celular grave
AB0	Classificação AB0 para tipagem sanguínea
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AMR	do inglês, Antibody-mediated rejection: rejeição humoral
APC	do inglês, Antigen-presenting cell: célula apresentadora de antígenos
AVEH	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
B7-1	Molécula de adesão: fator co-estimulador
BAV	Bloqueio de ramo atrio-ventricular
BEM	Biópsia endomiocárdica
C0	Dosagem realizada antes da 1ª dose diária da medicação
C1q	Fração do Complemento C1q
C3d	Fração do Complemento C3d1q
C4d	Fração do Complemento C4d
CD	do inglês, Cluster of Differentiation : antígeno de superfície celular
CD154	Células com expressão do antígeno CD154
CD25	Células com expressão do antígeno CD25

CD4	Células com expressão do antígeno CD4: LT auxiliares
CD68	Células com expressão do antígeno CD68
CD8	Células com expressão do antígeno CD8: LT citotóxicos
CD80	Células com expressão do antígeno CD80
CD86	Células com expressão do antígeno CD86
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
CSA	Ciclosporina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FI	do inglês, Fluorescent Intensity:intensidade de fluorescência
H&E	Hematoxilina-eosina
HLA	do inglês, Human leukocyte antigen: Antígenos leucocitários humanos
HLA-A	Antígenos leucocitários humanos, gene A
HLA-B	Antígenos leucocitários humanos, gene B
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos, gene DR
IC	Insuficiência Cardíaca
IFNgama	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina classe A
IgG	Imunoglobulina classe M
IgM	Imunoglobulina classe G
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2

IL-6	Interleucina 6
INC	Instituto Nacional de Cardiologia
ISHLT	do inglês, International Society for Heart and Lung Transplantation
MFS	Micofenolato de sódio
MHC	do inglês, Major Histocompatibility Complex: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MM	do inglês, mismatch: incompatibilidade
MICA	do inglês, major histocompatibility class I-related chain A
MMF	Micofenolato de sódio
NYHA	do inglês, New York Heart Association
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RSSO	Sonda de oligonucleotídeos de sequência específica
PCR-CMV	reação em cadeia de polimerase para detectar DNA do citomegalovírus
PRA	Painel de Reatividade Antigênica
RCA	Rejeição Celular Aguda
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SUS	Sistema Único de Saúde
TAC	Tacrolimus
TCD4+	Linfócitos com expressão do antígeno CD4: auxiliares
TCD8+	Linfócitos com expressão do antígeno CD8: citotóxicos
TCE	Traumatismo Cranio-encefálico
TCR	Receptor de células T

TOR	do inglês, target of rapamycin : receptor ligante da rapamicina
TX	Transplante
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
VD	Ventrículo direito
WHO	Do inglês, World Health Organization : Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Imunologia do Transplante: O Sistema MHC/LA.....	20
1.2. Rejeição ao enxerto cardíaco.....	23
1.2.1. Rejeição celular aguda.....	24
1.2.2. Rejeição aguda mediada por anticorpos moral).....	25
1.3 Esquema Imunomodulador padronizado.....	25
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo principal.....	31
3.2. Objetivo secundário.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Tipo de estudo.....	32
4.2. População estudada.....	32
4.2.1. Critérios de Inclusão.....	32
4.2.2. Critérios de exclusão.....	32
4.3. Coleta de dados.....	32
4.3.1. Instrumento de coleta.....	32
4.3.1.1. Receptor.....	32
4.3.1.2. Doador.....	33
4.4. Técnica para pesquisa e tipagem HLA.....	33
4.5. Técnica para pesquisa de anticorpos neo-formados.....	34

4.6. Biopsia endomiocárdica e diagnóstico de rejeição.....	35
4.7. Armazenamento de dados.....	38
4.8. Análise estatística.....	38
4.9. Aspectos Éticos.....	38
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	50
6.1. Limitações do Estudo.....	54
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9. ANEXOS.....	59

Lista de abreviações

1.INTRODUÇÃO

O transplante cardíaco (TX) continua sendo o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca (IC) refratária, apesar da grande melhora na qualidade e expectativa de vida com o tratamento clínico¹. Entre os anos de 2008 e 2013 foram realizados no Brasil 1226 transplantes cardíacos ².

De acordo com a legislação brasileira são candidatos ao transplante cardíaco, portadores de insuficiência cardíaca em classe funcional III e IV pela NYHA (*New York Heart Association*), portadores de arritmias consideradas malignas, com sintomas incapacitantes ou para alto risco de morte em um ano e sem a possibilidade do emprego de outros métodos terapêuticos clínicos ou cirúrgicos ³. De acordo com a II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) publicada em 2009, também são candidatos a TX os pacientes com doença cardíaca congênita sem possibilidade de correção cirúrgica¹.

A SBC descreve na III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica, publicada em 2009, a classificação de gravidade da insuficiência cardíaca pela NYHA ⁴.(Tabela 1)

Tabela 1: Classificação de gravidade da insuficiência cardíaca pela NYHA.

Classificação de gravidade da insuficiência cardíaca pela NYHA.

Classe I - ausência de sintomas (dispneia) durante atividades cotidianas.

Classe II - sintomas desencadeados por atividades cotidianas;

Classe III - sintomas desencadeados em atividades menos intensas que as cotidianas ou aos pequenos esforços;

Classe IV - sintomas em repouso descrevem marcada limitação da atividade, confortáveis apenas em repouso.

NYHA: New York Heart Association

1.1. Imunologia do Transplante: O Sistema MHC / HLA

A grande limitação para o sucesso dos transplantes é a resposta imune do receptor ao tecido ou órgão doado. Esta observação teve início após tentativas sem sucesso de transplantar pele de doadores não aparentados para tratamento de queimaduras, particularmente durante a primeira guerra mundial. Após um período de 1 (uma) a 2(duas) semanas, a pele transplantada sofria necrose e se desprendia. Esta observação prática em humanos foi transposta para estudos em animais por George Snell e colaboradores nos anos 40⁷. Os pesquisadores criaram linhagens de camundongos endogâmicos por meio do acasalamento repetido entre irmãos, por aproximadamente 20 gerações. Estes animais eram homozigotos em todos os *locus* genéticos, portanto geneticamente idênticos entre si. Quando uma porção de pele era transplantada entre camundongos da mesma linhagem endogâmica não havia reação inflamatória, já entre animais de diferentes linhagens ocorriam inflamação e necrose do tecido. A reação inflamatória que se observava foi descrita como “rejeição”. Peter Medwar e outros pesquisadores demonstraram em seguida que havia diferentes tipos de rejeição.⁷ A chamada reação primária ocorria quando se realizava a primeira enxertia entre duas linhagens diferentes de camundongos. Na reação primária a inflamação se desenvolvia após 10 dias da enxertia. Numa segunda exposição esta reação era mais rápida, em três dias, e foi chamada reação secundária. A reação secundária também ocorria em camundongos na primeira enxertia, se recebessem linfócitos de uma linhagem que já havia apresentado rejeição a um enxerto anteriormente. Provou-se assim, tratar-se de uma resposta imune adaptativa⁷.

Apesar de o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) ter sido descoberto inicialmente como o *locus* genético cujos produtos eram responsáveis pela rejeição de transplantes entre linhagens de camundongo, esta não é sua função fisiológica. Na verdade sua função é codificar proteínas que permitem a interação entre os linfócitos T e as demais células do sistema imune, dentre elas linfócitos B e células dendríticas, sendo a chave para estudos da imunologia dos mamíferos.

As moléculas do MHC humano são chamadas de antígenos leucocitários humanos (HLA). Sua descoberta veio a partir dos estudos de Jean Dausset, Jan Van

Rood et al.⁷. Eles observaram que os pacientes que apresentavam rejeição aos enxertos renais ou reações a transfusões de leucócitos possuíam anticorpos circulantes (aloanticorpos) reativos aos antígenos presentes em leucócitos do sangue ou do órgão do doador (aloantígenos). A partir desta observação surgiu a hipótese de que estes aloantígenos seriam codificados por um grupo de genes polimórficos responsáveis pela distinção de tecidos próprios de não próprios. Os estudos com soro de pessoas polissensibilizadas (múltiparas, politransfundidos, dentre outras condições) permitiram a identificação de vários *loci* genéticos polimórficos, agregados em um único *locus* no cromossomo 6, cujos produtos eram reconhecidos pelos aloanticorpos. Como os aloantígenos eram expressos em leucócitos humanos foram chamados de antígenos leucocitários humanos (em inglês: Human Leucocyte Antigen: HLA).

O conjunto de alelos do MHC de cada cromossomo é chamado de haplótipo MHC e cada gene HLA recebe uma numeração. A nomeação de novos genes HLA e sequências de alelos é definida pela comissão “WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System”, que se reuniu pela primeira vez em 1968, estabelecendo critérios para denominação e padronização dos genes HLA. As últimas atualizações ocorreram durante a “14th International HLA and Immunogenetics Workshop” em Melbourne, Austrália em Dezembro de 2005 e em setembro de 2008, durante a “15th International HLA and Immunogenetics Workshop”, em Buzios, no Brasil.^{21,22} O significado de cada número e símbolo da nomenclatura HLA está descrito na Figura 1.

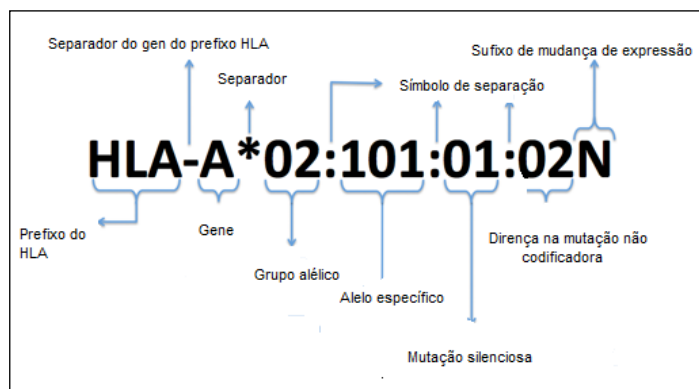


Figura 1- Nomenclatura HLA.

Novos alelos são determinados e classificados, sendo atualizações realizadas trimestralmente. Os três primeiros genes definidos foram chamados de HLA-A, HLA-B e HLA-C. Em seguida foram descritos os genes HLA-DR, HLA-DQ e HLA DP.^{21,22}

Os número de alelos oficialmente definidos ao longo dos anos é demonstrado no gráfico elaborado por Robinson et al.²² (Figura 2)

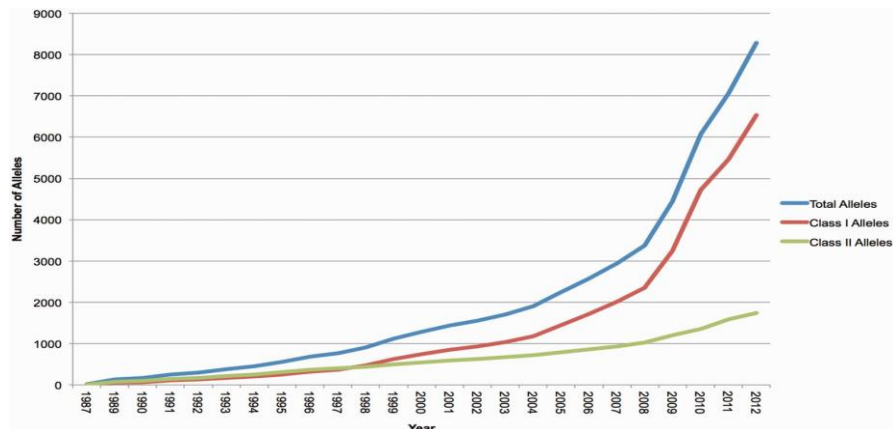


Figura 2- Polimorfismo dos genes HLA descritos até 2013.
Fonte: (Robinson J et al.)²²

Diante de um extenso número de possíveis combinações, torna-se mais claro entender a dificuldade de se formarem pares ideais, com pequeno número de incompatibilidades. Indivíduos homozigotos são aqueles que possuem um único haplótipo HLA.

Existem dois grupos de genes polimórficos do MHC que codificam grupos estruturalmente diferentes de proteínas, apesar de homólogas, as de Classe I e Classe II. As moléculas MHC da Classe I se expressam em todas as células nucleadas, apresentam peptídeos e são reconhecidas pelas células TCD8+ (linfócitos T citotóxicos). As moléculas MHC Classe II apresentam peptídeos para células T CD4+ (linfócitos T auxiliares) e se expressam principalmente nas células apresentadoras de antígenos especializadas, por exemplo, macrófagos e linfócitos B, mas também nas células endoteliais e do timo. As moléculas de Classe I são constituídas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma cadeia alfa codificada pelo MHC (ou cadeia pesada) e uma cadeia leve não codificada pelo MHC, a β -microglobulinas. As moléculas Classe II são constituídas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma cadeia α e um

cadeia β , ambas codificadas por genes MHC polimórficos. A expressão estável da molécula de Classe II na superfície celular exige a presença de um peptídeo antigênico a ela ligada (heterodímero).

Alem dos genes polimórficos da Classe I e II, o MHC contém genes que codificam as proteínas do complemento, citocinas e outras proteínas envolvidas no processamento de antígenos.

1.2. Rejeição ao enxerto cardíaco

A possibilidade de rejeição está sempre presente no transplante, tendo em vista a inexistência de compatibilidade genética total entre diferentes indivíduos da mesma espécie, que não gêmeos monozigóticos ⁷. Ela pode ser classificada de acordo com o tempo de apresentação (hiperaguda, aguda, crônica) ou de acordo com o principal componente imunológico envolvido (humoral/celular) ²³. As duas classificações na verdade são complementares, considerando-se neste caso apenas o aspecto conceitual, já que todo sistema imune atua em conjunto. A rejeição celular aguda no transplante de órgãos sólidos é mediada por linfócitos T (imunidade celular) com a contribuição dos linfócitos B (imunidade humoral).

Na rejeição ao enxerto cardíaco, a maioria dos pacientes inicialmente é assintomática, tornando necessária a realização de biópsias para detectar e tratar a rejeição antes que a disfunção se manifeste. ²⁴ A inflamação e a morte celular associada à rejeição aguda provoca inicialmente um edema tecidual com consequente aumento da rigidez miocárdica com disfunção diastólica, evoluindo para disfunção sistólica se não tratada. Os sintomas iniciais podem ser inespecíficos (fadiga, mal-estar, náuseas, vômitos e febre) ou de congestão cardíaca (dispneia, ortopneia ou dispneia paroxística noturna). Disfunção do ventrículo direito (VD) se manifesta com edema e distensão abdominal. Pode ocorrer taquicardia, palpitações e síncope, decorrentes de arritmias desencadeadas pela inflamação do miocárdio, assim como bradiarritmias (BAV). Inflamação do pericárdio pode produzir um atrito ou derrame pericárdico. O agravamento dessa condição leva a sintomas de baixo débito cardíaco (letargia, sonolência, oligúria e hipotensão) com franco choque cardiogênico. Raramente a rejeição pode apresentar-se como morte súbita antes do aparecimento de sintomas de disfunção do enxerto.

1.2.1. Rejeição celular aguda

A rejeição celular aguda (RCA) é mais frequente e por isso objeto de nosso estudo. Como é mais comum entre três e seis meses pós-transplante, foi definido este período de tempo para análise das biópsias endomiocárdicas^{7,25,26}. Aproximadamente 20% a 40% dos receptores de coração apresentará pelo menos um episódio de RCA no primeiro ano pós-operatório²⁴. O sistema imunológico pode reconhecer o órgão doado como estranho de maneira direta ou indireta. O reconhecimento direto ocorre quando as células apresentadoras de antígenos (APC) do doador migram a partir do enxerto para o tecido linfóide do receptor, sendo reconhecidas como estranhas pelas células T do receptor. De forma indireta, quando as células APCs do receptor processam e apresentam peptídeos do doador associados ao seu HLA para linfócitos T do receptor.

As células T são estimuladas pelas APCs através de vários sinais estimulatórios. O primeiro sinal se dá através do reconhecimento e ligação de antígenos à APC pelo receptor de células T (TCR) e seus correceptores (CD8 para MHC Classe I ou CD4 para MHC classe II). Este sinal garante a especificidade da resposta imune, mas é insuficiente para ativar células T na ausência de um sinal coestimulatório (segundo sinal). O segundo sinal envolve a interação das proteínas B7-1 e 2 (CD80 e CD86) expressas na APC com o CD28 do linfócito T. Após o segundo sinal há ativação da tirosina-quinase ZAP-70 que em seguida, aciona três vias principais para a regulação positiva do gene expressão em células T: 1) a via de cálcio-calciúrina, 2) a via do factor nuclear-kappa B, e 3) via ativação da proteína quinase. A ativação dessas vias leva a produção de citocinas (interleucina [IL] -2 e IL-15) e moléculas de CD25 (CD134). A ligação destas citocinas a seus respectivos receptores na superfície de linfócitos T gera o terceiro sinal, iniciando a proliferação celular via ativação da rapamicina (TOR). Os linfócitos T ativados migram do sistema linfóide e chegam ao endotélio vascular do coração transplantado. Ocorre infiltração de células T efetoras, macrófagos, células B e plasmócitos, amplificando a reação inflamatória e levando ao dano tecidual²⁴.

1.2.2.Rejeição aguda mediada por anticorpos (humoral)

A rejeição aguda mediada por anticorpos (AMR) é menos comum que a RCA, ocorrendo em cerca de 10% de pacientes que apresentam instabilidade hemodinâmica após transplante. Pacientes sensibilizados têm maior risco para rejeição humoral, por exemplo, múltiparas, politransfundidos e pacientes com suporte circulatório. A AMR aguda é desencadeada por linfócitos B ativados (plasmócitos), que produzem anticorpos contra antígenos do doador. Os linfócitos T são responsáveis por direcionar a produção dos anticorpos pelos linfócitos B. A ligação do receptor de linfócitos B ao antígeno leva à ativação de linfócitos B, sua proliferação e maturação em plasmócitos, produção de anticorpos circulantes, ativação do complemento, lesão das células endoteliais, recrutamento de células inflamatórias (como exemplo, neutrófilos), edema intersticial, trombo intravascular, isquemia do miocárdio com lesão dos miócitos e disfunção do enxerto.

RCA e AMR podem coexistir em até 25% dos episódios de rejeição aguda. O diagnóstico de AMR se baseia na análise imuno-histoquímica da biópsia endomiocárdica (BEM), com a presença de imunoglobulina (IgG, IgM ou IgA), fragmentos do complemento (C3d, C4d, C1q) ou de células CD68 positivas (macrófagos), bem como o aparecimento de neoanticorpos circulantes contra o HLA do doador³³.

1.3. Esquema imunomodulador padronizado:

Nosso protocolo se baseia no uso de drogas com ação complementar, permitindo a administração de baixas dosagens, minimizando os efeitos colaterais, sem perda da eficácia. A combinação básica proposta pode ser modificada de acordo com as características específicas de cada receptor e sua evolução clínica. A terapia tríplice compreende: um inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), um agente antiproliferativo (micofenolato de mofetil ou mocoferenolato de sódio) e corticosteróides. Adotamos a não utilização de rotina a Terapia de Indução com anticorpos policlonais ou monoclonais. O uso destes medicamentos é reservado apenas para pacientes com alto risco de rejeição e em casos específicos de

insuficiência renal pré-transplante, visando retardar o início dos imunossupressores nefrotóxicos.

CORTICOSTERÓIDE: atua sobre a imunidade celular e humoral, com efeito antiinflamatório, imunossupressor e antiproliferativo. Dentre seus diversos mecanismos de ação, atua inibindo a síntese de IL1, IL2 e IL6 em macrófagos e monócitos, bloqueando a proliferação de linfócitos.

Metilprednisolona é aplicada no perioperatório: 500 mg via endovenosa na indução anestésica e na saída do Centro Cirúrgico. Segue-se a redução gradativa da metilprednisolona, passando para prednisona, via oral assim que possível. Dose de manutenção de prednisona, via oral, é de 0,2 mg/kg/dia. Suspensão completa após 6 (seis) meses de transplante, caso não haja rejeição.

INIBIDORES DE CALCINEURINA:

TACROLIMUS (TAC): é um macrolídeo. Liga-se à proteína de ligação ao FK (FKBP-12), bloqueando a transcrição de genes e a formação de citocinas, tais como IL-2 e interferon gama (IFN γ). O efeito final é a inibição da ativação de linfócitos T. Dose: 0,075 mg/kg/dia. Controle da dose ideal pelo nível sérico.

Níveis séricos ideais em amostra de sangue colhido imediatamente antes da primeira dose diária (C0): de 0 a 6 meses: 10-15 ng/ml; de 6 a 18 meses: 5-15 ng/dl; > 18 meses: 5-10 ng/ml.

CICLOSPORINA (CSA): reduz a síntese e liberação de IL2, e consequentemente inibindo a proliferação de linfócitos T. Dose: 3-4 mg/kg/dia.

Níveis séricos ideais (C0): de 0 a 3 meses: 150-400 ng/dL; de 3 a 12 meses: 150-300 ng/dL ; >12 meses: 100-250 ng/dL .

AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS:

MICOFENOLATO DE MOFETIL (MMF) ou MICOFENOLATO DE SÓDIO (MFS): atuam inibindo a inosina monofosfato desidrogenase, enzima essencial para síntese *de novo* de nucleotídeos de guanossina, bloqueando a síntese de DNA. Promovem inibição da proliferação de linfócitos, fibroblastos, células endoteliais e fibras musculares lisas arteriais. Inibe também função das moléculas de adesão envolvidas na ancoragem de linfócitos ao endotélio.

Dose: MICOFENOLATO DE MOFETIL: 1g/dia; MICOFENOLATO DE SÓDIO: 1,44 g/d.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

A sobrevida após transplante cardíaco tem aumentado consideravelmente nas ultimas duas décadas. Este fato se deve ao aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, modernas abordagens no pós-operatório, desenvolvimento de imunossupressores mais eficientes e novos métodos diagnósticos^{1, 4}.

Estudos americanos estimam a sobrevida em 10 anos em 50%, sendo que 25% dos transplantados vivem por mais de 17 anos ⁵. Segundo a estatística brasileira, a sobrevida em 4 (quatro) anos é de 68%, dados do último Registro Brasileiro de Transplantes realizado em 2013, pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO).² O aumento da sobrevida , com conseqüente exposição prolongada aos imunossupressores, pode levar a diversas complicações a longo prazo, tais como infecções, obesidade, hipertensão, insuficiência renal, diabetes, dislipidemia, neoplasias^{2,5}. O uso destas medicações deve, portanto, ser criteriosamente avaliada, evitando ao máximo o surgimento de complicações sem permitir rejeição ao enxerto cardíaco ⁶.

O reconhecimento de células transplantadas como próprias ou estranhas é controlado por genes polimórficos herdados de ambos os pais de maneira codominante. Estes genes, presentes em todos os mamíferos, estão localizados no *locus* chamado de complexo principal de histocompatibilidade (MHC). No ser humano se encontram dentro da região 6p21.3-se no braço curto do cromossomo 6. (Figura 3)

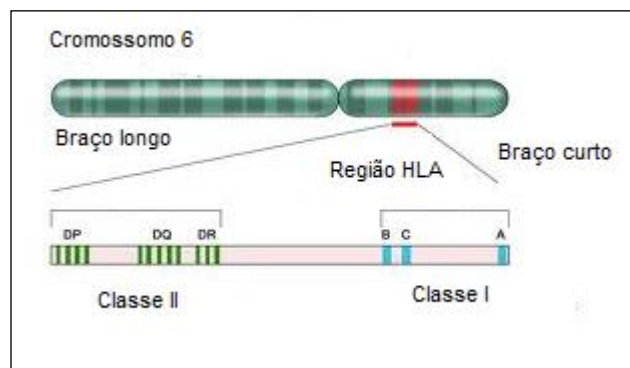


Figura 3: Estrutura do cromossomo 6.

Os dois principais produtos dos genes MHC são moléculas da classe I e da classe II. Como estas moléculas foram detectadas em leucócitos humanos, são chamadas em nossa espécie de antígenos leucocitários humanos (HLA) e constituem os ligantes reconhecidos pelos linfócitos T.⁷ (Figura 4).

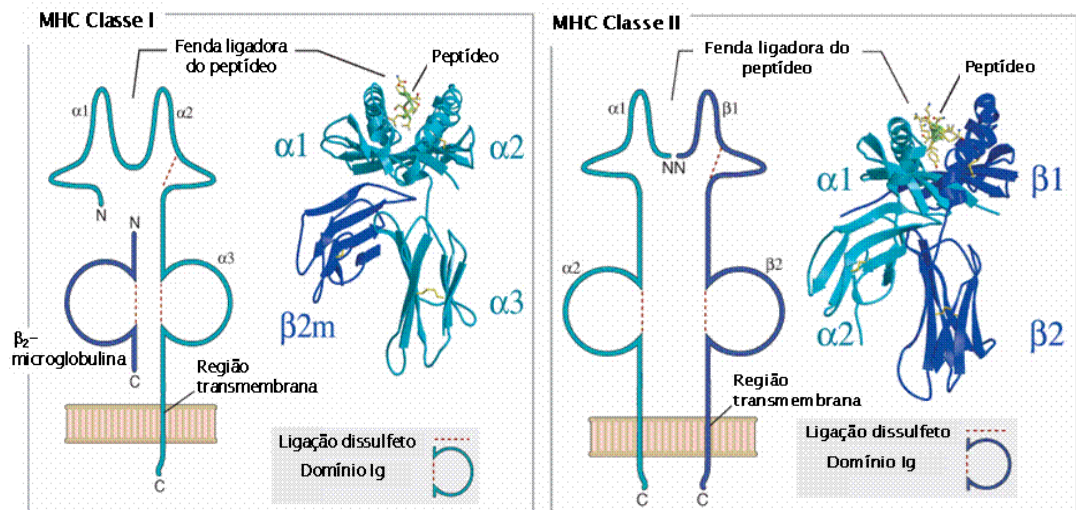


Figura 4- estrutura molecular das moléculas HLA Classe I e Classe II (WWW.ufpe.br).

No transplante renal a seleção do receptor ideal para o órgão doado é feita pela análise da incompatibilidade HLA e pela realização de prova cruzada pré-transplante.^{8,9} O Ministério da Saúde por meio da Portaria N^o 2.600³, de 21 de outubro de 2009, regulamentou o Sistema Nacional de Transplantes, criando regras que organizam “toda e qualquer atividade relacionada à utilização de células, tecidos, órgãos ou partes do corpo para fins de transplante em todo o território nacional.” O Art. 54³ define: “a seleção dos potenciais receptores para fins de transplante de rim será processada mediante identidade no sistema ABO e por exame de histocompatibilidade, avaliadas as incompatibilidades no sistema HLA entre doador e receptor. Serão atribuídos pontos para um receptor, baseando-se no número de incompatibilidades nos loci HLA A, B e DR entre doador e receptor.” Esta pontuação está de acordo com estudos clínicos que comprovam no TX renal uma maior frequência de rejeição quanto maior a incompatibilidade HLA, particularmente entre alelos HLA-DR. Os alelos HLA são expressos de maneira codominante, por isso, na investigação e tipagem dos *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DR pode-se

observar de zero a seis incompatibilidades (MM, do inglês *mismatches*) entre doador e receptor, já que são expressos dois alelos de cada *loci*. O receptor que obtiver maior pontuação será o escolhido para receber o órgão doado. (Tabela 2)

Tabela 2: Tabela de pontuação para fins de classificação pelo número de incompatibilidades no sistema HLA na seleção de receptores em transplante renal.

Número de incompatibilidades HLA

I - no locus DR :

- a) 0 incompatibilidade = 10 pontos
- b) 1 incompatibilidade = 5 pontos
- c) 2 incompatibilidades = 0 ponto

II - no locus B:

- a) 0 incompatibilidade = 4 pontos
- b) 1 incompatibilidade = 2 pontos
- c) 2 incompatibilidades = 0 ponto

III - no locus A:

- a) 0 incompatibilidade = 1 ponto
 - b) 1 incompatibilidade = 0,5 ponto
 - c) 2 incompatibilidades = 0 ponto.
-

No Art. 103 da portaria N^o 2.600³, de 21 de outubro de 2009, também estão descritos os critérios para seleção dos potenciais receptores para transplante cardíaco: compatibilidade ABO doador x receptor, peso doador x receptor, priorização, características do doador e tempo de espera. Não há necessidade da tipagem HLA. Para transplantes realizados em caráter de prioridade, o doador e o receptor devem respeitar apenas compatibilidade em relação ao sistema ABO ^{1,9,10}. Estão incluídos no critério de prioridade os pacientes em uso de suporte mecânico e/ou respiração assistida/controlada, em uso de balão intra-aórtico ou assistência

ventricular mecânica, dependência de circulação extracorpórea, coração artificial com instabilidade hemodinâmica e com necessidade de retransplante.^{1,3,11}

Existe no transplante cardíaco uma dificuldade logística para realização de testes de compatibilidade entre doador e receptor, tendo em vista o curto período de tempo disponível entre a captação e o implante do órgão, idealmente inferior a 4 (quatro) horas.

Pela inexistência de um consenso quanto à utilidade clínica da avaliação de compatibilidade HLA para seleção do receptor no transplante cardíaco, este não é utilizado na prática diária.^{8,12} Trabalhos demonstram que no transplante cardíaco, a compatibilidade HLA-A, B e DR aumenta a sobrevida e reduz episódios de rejeição.^{13,14} A incompatibilidade HLA-DR, em particular, influencia diretamente na frequência de episódios de rejeição nos primeiros meses após o transplante, interferindo de maneira negativa no prognóstico de sobrevida em longo prazo.¹⁵⁻¹⁸ Alguns autores recomendam inclusive um esquema imunossupressor mais intenso nos pacientes com incompatibilidade HLA-DR^{6,15-16}. Outros trabalhos não encontraram qualquer significância estatística na sobrevida em longo prazo em relação à compatibilidade HLA entre doadores e receptores no transplante cardíaco e no transplante pulmonar, apesar da maior incidência de rejeição no primeiro ano após o transplante^{19,20}.

Não há avaliação da frequência de compatibilidade HLA nos transplantes realizados em nossa Instituição, responsável por 87% dos transplantes cardíacos no Estado do Rio de Janeiro². Não sabemos se é necessário um acompanhamento diferenciado nos casos de maior incompatibilidade HLA. Existe uma correlação entre a incompatibilidade HLA e a frequência de rejeição ao enxerto cardíaco nos pacientes do INC? A determinação da compatibilidade HLA entre doador e receptor no transplante cardíaco é útil na prática clínica?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal:

Correlacionar o número de incompatibilidades HLA com a frequência de rejeição celular aguda ao enxerto cardíaco nos primeiros 6 (seis) meses após o transplante.

3.2 Objetivo secundário:

Pesquisar no soro de receptor, a presença de anticorpos *neoformados* anti-HLA Classe I, Classe II e anti-MICA.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudo: Estudo de Coorte, incluindo todos os pacientes maiores de 18 anos submetidos ao transplante cardíaco no INC, no período entre 01/01/2008 e 31/12/2013. Foi realizada uma análise retrospectiva dos primeiros seis meses após o transplante, correlacionado à frequência de rejeição ao enxerto, diagnosticado por biópsia endomiocárdica, com o número de incompatibilidades HLA entre o doador e seu receptor.

4.2. População: Pacientes maiores de 18 anos transplantados no INC com segmento de seis meses após o transplante. Todos os receptores foram compatíveis em relação à tipagem ABO com seus doadores e não possuíam anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II prévios (PRA negativo).

4.2.1. Critérios de inclusão: maiores de 18 anos transplantados no INC, que tivessem realizado biópsia endomiocárdica para avaliação de rejeição ao enxerto.

4.2.2. Critérios de exclusão: doadores ou receptores que foram a óbito sem HLA determinado.

4.3. Coleta de dados: Banco de dados do Serviço de Insuficiência Cardíaca e Transplante do INC, prontuários do INC, resultados dos exames realizados no Laboratório de HLA do HemoRio e do Laboratório de HLA da Policlínica Piquet Carneiro-UERJ, Banco de Dados sobre doadores do Programa Estadual de Transplantes do Estado do Rio de Janeiro.

4.3.1. Instrumento de coleta: Foi criado e utilizado um formulário eletrônico (planilha de dados Microsoft® Office Excel versão 2003) contendo as seguintes informações: (Anexo C)

4.3.1.1. Receptor: Nome, prontuário, data de nascimento (idade), sexo, raça, tipagem sanguínea, tipagem HLA (HLA-A, HLA-B e HLA DR), PCR positivo para CMV, data do transplante, etiologia da patologia de base, data da realização e a

classificação do grau de rejeição (classificação ISHLT) de todas as biópsias endomiocárdicas realizadas nos primeiros 6 (seis) meses após o transplante, pesquisa de anticorpos *neoformados* anti-HLA Classe I, Classe II e Ac anti-MICA (grupos de alelos 01, 04, 12, 18, 27 e 02, 07, 09, 17, 19).

4.3.1.2. Doador: Identificação (numerados de 1 a 25), idade, sexo, causa do óbito, tipagem sanguínea, tipagem HLA (HLA-A, HLA-B e HLA DR).

Os exames para Tipagem do HLA de todos os doadores e dos receptores transplantados à partir de 2011 foram realizados no Laboratório de HLA do HemoRio. A Tipagem do HLA dos receptores transplantados antes de 2011 foi realizada pelo Laboratório de HLA da Policlínica Piquet Carneiro-UERJ, que também fez a pesquisa de anticorpos *neo-formados* pelos receptores (anti- HLA Classe I, Classe II e Ac anti-MICA (grupos de alelos 01, 04, 12, 18, 27 e 02, 07, 09, 17, 19)).

4.4. Técnica para pesquisa e tipagem HLA

Atualmente todo paciente candidato a transplante cardíaco tem o HLA tipificado durante sua avaliação ambulatorial, quando é realizada a pesquisa de anticorpos pré-formados (PRA). Os pacientes transplantados entre os anos de 2008 e 2010 não foram submetidos a esta tipagem, sendo assim, quando foram colhidas amostras para pesquisa de anticorpos *neoformados* anti-HLA, foi realizada a tipagem HLA destes pacientes.

O DNA analisado é extraído de leucócitos. As amostras de sangue centrifugadas podem ser usadas imediatamente após a separação ou armazenadas a -20° (ou abaixo) por longos períodos de tempo (acima de um ano) sem prejuízo das mesmas. Devem ser transportadas a -4° ou abaixo para preservar sua integridade durante o transporte. Para extração do DNA as células são lisadas em condições de desnaturação a temperaturas elevadas, na presença de protease e de solução-tampão específica. Para otimizar a ligação do DNA genômico à membrana da coluna para centrifugação adiciona-se etanol ao lisado. Cada lisado é então aplicado à coluna para centrifugação, o DNA genômico é adsorvido sobre a membrana de sílica-gel e o lisado passa pela coluna por aplicação de vácuo ou força

centrífuga. Enquanto o DNA genômico permanece ligado à membrana da coluna para centrifugação, os contaminantes são retirados por sucessivas lavagens. O DNA genômico purificado é eluído da membrana da coluna para centrifugação com a utilização de Tampão de Eluição e está pronto para ser amplificado pela técnica de PCR.

O método utilizado pelo laboratório de HLA da UERJ foi de PCR-RSSO: amplificação de genes com iniciadores para exons 2 e 3 para os locos A e B e exon 2 para o loco DRB1; reação em cadeia polimerase, hibridização com oligonucleotídeos sequência específica e tipificação por citometria de fluxo. Kit fabricado pelo Laboratório ONE LAMBDA, lote: HLA A: RSSO1A-013-05, HLA B: 1B-016-07 e DRB1: 2B-017-06^o(figura Z)

Este teste utiliza sondas de oligonucleotídeos de sequência específica (SSO), fixos em microesferas para identificação de alelos de HLA em amostras de DNA genômico, amplificadas através de PCR e posterior hibridização. A análise é realizada em citômetro de fluxo, utilizando o analisador de fluxo Luminex^{27,28}. O Analisador Luminex identifica a intensidade de fluorescência (FI: intensidade fluorescente) em cada microesfera. O *software* de análise que acompanha o teste auxilia na determinação de genotipagem da amostra de DNA. Cada Kit de teste para tipagem de determinado *locus* contém representantes de todos os alelos já encontrados até o momento, sendo constantemente atualizados à medida que novos alelos são descobertos. O conjunto de microesferas marcadas com fluorescência transporta em sua superfície sondas únicas de oligonucleotídeos de sequência específica para alelos HLA. Cada mistura de microesferas possui um controle positivo e negativo, neutralizando possíveis alterações em quantidade e eficiência de reação.

4.5. Técnica de pesquisa de anticorpos neoformados

A coleta do sangue foi realizada em diferentes momentos após o transplante, variando de oito meses a seis anos da data da cirurgia.

Realizada pesquisa da Reatividade Conta Painel Misto HLA Classe 1, Classe 2 e MICA em amostras de sangue dos receptores, pelo método de citometria de fluxo com microesferas eletromagnéticas recobertas com antígenos HLA Classe I,

Classe II ou MICA^{9,26}. Trata-se de uma metodologia com alta sensibilidade e especificidade.^{26,28,29} O Teste foi fabricado pela ONE LAMBDA, lote LSM12NC13_019_00. Os kits utilizados pelo laboratório responsável pela realização dos exames foram específicos para os seguintes antígenos MICA: 01,04,12,18,27 e 02,07,009,17,19.

As microesferas são revestidas com antígenos HLA de classe I, HLA classe II e MICA, os reagentes são pré-otimizados para detecção de anticorpos HLA classe I, II e MICA em soro humano. A leitura é feita por um analisador de fluxo para aquisição de dados e análise dos mesmos. O soro teste é incubado com as microesferas revestidas com antígenos purificados, podendo ser combinadas com até 100 microesferas diferentes em uma suspensão para um único teste. Qualquer anticorpo presente no soro-teste se ligará aos antígenos, sendo marcados com anticorpos anti-IgG humano (de cabra). O analisador de fluxo detecta a emissão fluorescente de cada microesfera. O padrão de reação do soroteste é comparado a uma planilha de leitura lote-específico, definindo a série de antígenos e a especificidade dos anticorpos HLA e MICA. O resultado é expresso em mediana e intensidade de fluorescência (FI).

4.6. Biópsia endomiocárdica e diagnóstico de rejeição

A ocorrência de rejeição celular ao enxerto foi determinada pela análise das biópsias endomiocárdicas, consideradas o padrão-ouro para o diagnóstico de RCA. Foram realizadas nos primeiros seis meses após o transplante cardíaco. As amostras são colhidas de tecido endomiocárdico em ventrículo direito, acessado pela veia jugular interna ou veia femoral. O biótomo é posicionado através de fluoroscopia ou ecocardiografia de modo a biopsiar o septo interventricular. Coletadas de 3 a 5 amostras, com diâmetro entre dois e três milímetros, processadas em parafina, seccionadas e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e coloração especial de tricrômio de Gomori para análise em microscopia óptica. São utilizadas outras técnicas de coloração somente na suspeita de diferentes diagnósticos, que não rejeição. De acordo com a rotina do Serviço de Transplante do INC, são realizadas biópsias regulares após o transplante cardíaco: duas no primeiro mês, uma no terceiro, sexto e décimo-segundo mês. Em caso de

rejeição o exame é repetido após duas semanas de tratamento. Após o primeiro ano são realizadas biópsias apenas em caso de suspeita de rejeição.¹¹ Entre 2008 e 2011 era preconizado um número maior de biópsias nos primeiros seis meses após o transplante, o que pode ser observado na análise dos pacientes transplantados neste período.

As amostras foram classificadas de acordo com os achados histológicos definidos pela International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) em 1990 e revistos em 2005.²⁵ (Tabela 3) (Figuras 5, 6, 7 e 8)

Tabela 3: Classificação histológica de biópsias endomiocárdicas pela International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).

Classificação histopatológica ISHLT
0R -ausência de rejeição: aspecto normal, sem evidência de infiltração celular mononuclear (linfócitos/macrófagos).
1R - rejeição leve: infiltrado focal, perivascular e/ou intersticial de células mononucleares (linfócitos/histiócitos), sem dano ao miócito e preservando a arquitetura tecidual. Pode estar presente um foco de infiltrado mononuclear com miocitólise pontual.
2R -rejeição moderada: presença de 2 ou mais focos de infiltrado mononuclear (linfócitos/macrófagos) com dano aos miócitos. Podem estar presentes eosinófilos. Mais de uma amostra pode estar comprometida, porém existe áreas de miocárdio preservadas entre os focos de infiltrado mononuclear.
3R -rejeição grave: processo inflamatório difuso, com predomínio de linfócitos e macrófagos ou com infiltrado polimórfico. Geralmente com lesões em várias amostras biopsiadas, com grau variado de acometimento. Várias áreas com miocitólise estão presentes, podendo nos casos mais graves haver edema, hemorragia intersticial e vasculite.

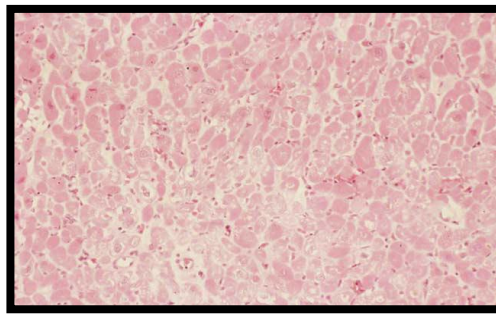


Figura 5. Grau 0R: Bem normal, sem evidências de infiltrado celular (H&E).

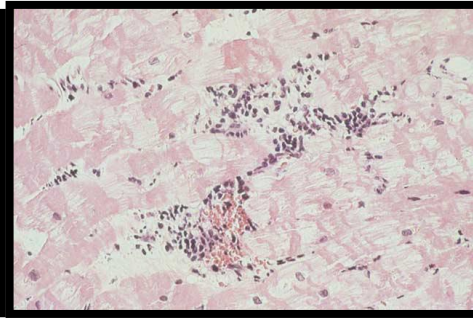


Figura 6. Grau 1R: Presença de infiltrado perivascular e intersticial sem evidência de dano ao miócito (H&E).

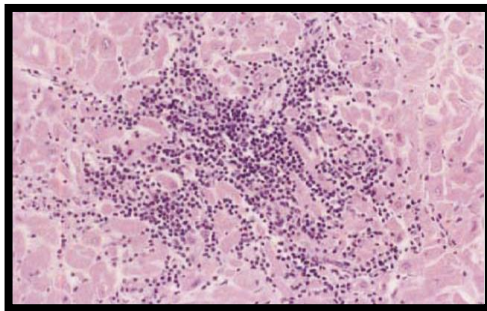


Figura 7. Grau 2R: visão em alta resolução de um foco de lesão com infiltrado inflamatório e dano ao miócito com alteração de arquitetura tecidual (H&E).

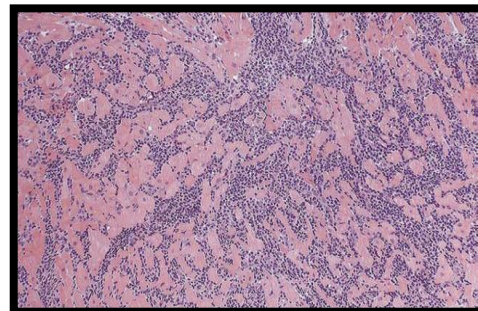


Figura 8. Grau 3R: dano difuso, inflamatório intenso e áreas de necrose tecidual, perda da arquitetura habitual (H&E)

Foram consideradas neste estudo, para o diagnóstico de rejeição clinicamente significativa, as biópsias classificadas como **2R** e **3R** pela Classificação ISHLT ²⁵. Este critério foi utilizado para apenas estes casos por ser necessária intervenção terapêutica e, portanto haver relevância na prática clínica.

Os procedimentos acima descritos fazem parte da rotina de avaliação já protocolada pelo Serviço de Insuficiência Cardíaca e Transplante do INC, realizados pelo Serviço de Hemodinâmica e pelo Serviço de Patologia.

Inicialmente o Serviço contava com apenas uma profissional e à partir do ano de 2013, de duas.

As biópsias foram preparadas e analisadas pelo Serviço de Patologia do INC. Duas médicas patologistas participaram da análise histológica. Inicialmente o Serviço contava apenas com uma profissional e a partir do ano de 2013, foi acrescido de mais uma.

Os critérios utilizados para diagnóstico de rejeição humoral não foram objeto deste estudo, portanto não serão detalhados.

4.7. Armazenamento dos dados:

Após a coleta, os dados foram armazenados em Banco de dados Excell compatível com Soft SPSS v13-0 for Windows. Todos estes dados foram digitados pela pesquisadora.

4.8. Análise estatística:

As variáveis categóricas foram descritas como contagem e proporção; as numéricas como média e desvio-padrão (distribuições normais) ou mediana. As diferenças entre o grupo com e sem rejeição foram avaliadas por meio dos testes qui-quadrado ou exato de Fisher (variáveis categóricas).

4.9. Aspectos Éticos:

O projeto foi submetido ao Comitê de ética em pesquisa (CEP) em 03/09/2013, respeitando as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466, de dezembro de 2012 ³⁰. Estudo aprovado em 03/10/2013 sob o número: 19666713.70000.5272.

Foi elaborado e preenchido o Termo de Confidencialidade (anexo A) para pesquisa em prontuário e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo B), utilizando-se linguagem coloquial simples. Estes foram lidos pela pesquisadora juntamente com o paciente, sendo-lhe explicados todos os detalhes do projeto e esclarecidas suas dúvidas. Somente após o perfeito entendimento do termo e

havendo concordância, ele foi assinado em duas vias, ficando uma em poder do pesquisador e a outra entregue ao paciente.

5. RESULTADOS

No período analisado foram realizados 39 transplantes cardíacos em adultos no INC. Destes, 14 foram excluídos, restando 25 casos, como mostra a Figura 9.

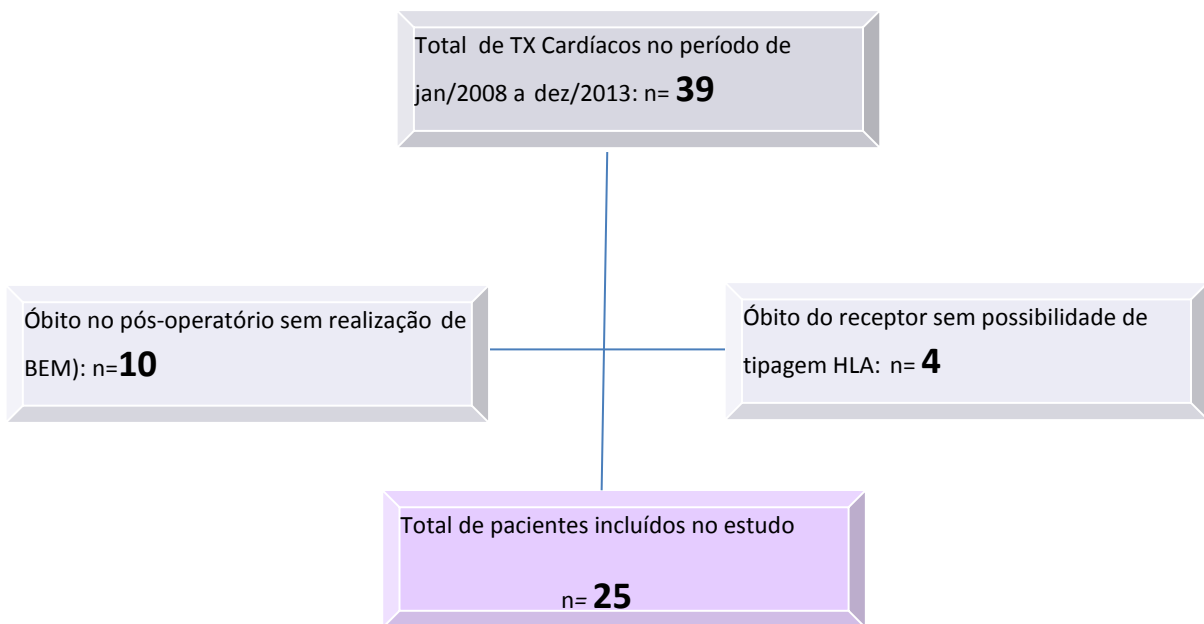


Figura 9- Pacientes incluídos no estudo.

Foram incluídos no estudo 25 receptores de transplante cardíaco, sendo 4 (16%) do sexo feminino e 21 (84%) do sexo masculino; 20 brancos (80%) e 5 negros (20%). A idade variou de 20 a 62 anos (média de 47 anos). Tipagem sanguínea AB0 – 13: 0 (52%), 7: A (27%), 2: AB (8%) e 3: B (12%). (Tabela 4) Viremia por CMV ocorreu em 14 (56%) dos receptores. Doença de base dos receptores: cardiomiopatia dilatada idiopática (6 casos), cardiopatia isquêmica (7 casos), Doença de Chagas (5 casos), amiloidose (1 caso), cardiomiopatia dilatada com as seguintes etiologias: alcoólica (1 caso), infecciosa (1 caso), periparto (1 caso), valvar (2 casos), pós quimioterapia (1 caso). (Tabela 5)

A faixa etária dos doadores variou entre 12 e 43 anos (média de 28 anos), sendo 8 (32%) do sexo feminino e 17 (68%) do sexo masculino. Tipagem sanguínea AB0 – 0: 16 (64%), A: 6 (24%) e B: 3 (12%). (Tabela 4) A causa do óbito dos doadores se dividiu entre: acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH): 13 casos (52%), traumatismo crânio encefálico (TCE): 12 casos (48%).(Tabela 6) Na

definição de TCE foram incluídos diversos agentes desencadeantes traumáticos, tais como: acidente automobilístico, queda, ferimento por arma de fogo ou arma branca.

Em 15 (60%) transplantes a doação ocorreu entre pares do mesmo sexo, sendo 1 (1%) entre mulheres e 14 (58%) entre homens. Houve ainda 3 (12%) receptores femininos com doadores masculinos e 7 (28%) receptores masculinos com doadores femininos.

Tabela 4- Dados demográficos dos doadores e receptores.

	Receptor (n = 25)	Doador (n = 25)
Idade média (anos)	46,88	28,48
Sexo		
Feminino (n%)	4(16%)	8(32%)
Masculino(n%)	21(84%)	17(68%)
Tipo sanguíneo		
O (n%)	13(52%)	16(63%)
A (n%)	7(27%)	6(24%)
B (n%)	3(13%)	3(13%)
AB (n%)	2(8%)	0(0%)

Tabela 5- Doença de base dos receptores.

Doença de base do receptor	
Cardiomiopatia dilatada idiopática (n%)	7 (28%)
Cardiopatia isquêmica (n%)	6 (24%)
Doença de chagas (n%)	5 (20%)
Amiloidose (n%)	1 (4%)
Outras (n%)	6 (24%)

Tabela 6- Causa do óbito do doador

Causa do óbito do doador	
AVEH (n%)	13(52%)
TCE (n%)	12(48%)

Foram excluídos 14 pacientes, que não preencheram os critérios de inclusão. Neste grupo 3 (21%) eram do sexo feminino e 11 (79%) do sexo masculino. A idade variou de 41 a 58 anos (média de 48 anos). Tipagem sanguínea AB0 – 6: 0 (43%), 5: A (36%), 3: AB (21%) e nenhum B. Doença de base dos receptores excluídos: cardiomiopatia dilatada idiopática (4), cardiopatia isquêmica (2), Doença de Chagas (5), cardiomiopatia dilatada com as seguintes etiologias: alcoólica (1), valvar (1), cardiopatia restritiva (1). (Tabela 4)

Dentre os 14 excluídos, 10 foram a óbito no período de pós-operatório imediato, menos de 13 dias após cirurgia, não sendo possível a realização de BEM. A causa destes óbitos foi associada às seguintes complicações clínico-cirúrgicas: discrasia sanguínea (3), disfunção de VD (2), AVE hemorrágico (1) e infecção (choque séptico) (4). Nenhum destes receptores apresentou evidência clínica de rejeição. Outros 4 transplantados foram a óbito mais tardiamente: 3º mês (1) , 4º mês (2) e no 9º mês (1). A causa do óbito destes transplantados foi: infecção (2), causa indeterminada por perda de segmento (1) e disfunção grave do enxerto (1). Esta última paciente, falecida no 4º mês de pós-operatório, apesar da disfunção grave do enxerto que a levou ao óbito, apresentava BEMs sem sinais de rejeição celular. Não foi possível o diagnóstico de certeza de rejeição humoral (AMR) por não haver disponibilidade de imuno-histoquímica ou de pesquisa específica de anticorpos anti-HLA na ocasião, permanecendo AMR como provável diagnóstico.(Tabela 7)

Tabela 7- Características dos receptores excluídos da amostra

Receptores excluídos da amostra	
(n = 14)	
Idade média (anos)	46,88
Sexo	
Feminino (n%)	3(21%)
Masculino (n%)	11(79%)
Tipo sanguíneo	
O (n%)	6(43%)
A (n%)	5(36%)
B (n%)	0(0%)
AB (n%)	3(21%)
Doença de base do receptor	
Cardiomiopatia dilatada idiopática (n%)	4(29%)
Cardiopatía isquêmica (n%)	2(14%)
Doença de chagas (n%)	5(36%)
Outras (n%)	3(21%)
Causa do óbito	
Discrasia sanguínea (n%)	3(22%)
Disfunção de VD (n%)	2(14%)
AVE hemorrágico (n%)	1(7%)
Infecção (n%)	6(43%)
Indeterminada (n%)	2(14%)

Todos os pacientes estudados fizeram uso de esquema imunossupressor tríplice, composto por corticóide (metilprednisolona e prednisona), inibidor de calcineurina (tacrolimo ou ciclosporina) e antiproliferativos (Micofenolato de mofetil ou micofenolato de sódio), nas doses já descritas no item 1.3. Um dos pacientes, além deste esquema tríplice, recebeu anticorpo monoclonal (basiliximabe)

imediatamente antes da realização do transplante. Esta medicação, chamada de indutora, tem como objetivo retardar a introdução de inibidores de calcineurina nos pacientes com insuficiência renal, caso do paciente em questão. (Tabela 8)

Tabela 8- Esquema imunossupressor utilizado.

Esquema imunossupressor	
(n=25)	
Inibidor de calcineurina (n%)	25(100%)
Anti-proliferativo (n%)	25(100%)
Corticoide (n%)	25(100%)
Indução (Basiliximabe) (n%)	1(4%)

Todos os receptores realizaram pesquisa de anticorpos pré-formados (PRA) na avaliação pré-transplante. Nenhum dos receptores apresentava anticorpos anti-HLA para Classe I e Classe II (PRA negativo).

Foram realizadas 142 BEMs nos 25 pacientes incluídos no estudo (n=25), distribuídas de maneira não uniforme ao longo do tempo. Os transplantados entre os anos de 2008 e 2011 foram submetidos a um número maior de biópsias, em média 09 exames, segundo protocolo do INC utilizado neste período. A partir de 2012, foi modificado o protocolo, reduzindo-se o número de biópsias programadas para uma média de 04 procedimentos nos primeiros 6 (seis) meses.

Do total de 142 biópsias endomiocárdicas analisadas pelo Serviço de Patologia, obtivemos o seguinte resultado - 78: 0R (55%), 57: 1R (40%) e 7: 2R (5%). Os dados são descritos na Figura 10. Não houve amostra 3R. Os resultados 0R e 1R foram agregados e considerados como ausência de rejeição significativa. Resultados 2R foram considerados como rejeição, com necessidade de intervenção terapêutica. Houve diagnóstico de rejeição em 6 (24%) dos receptores, no período de 6 meses após o transplante. Um dos receptores apresentou 2 (dois) episódios de rejeição.

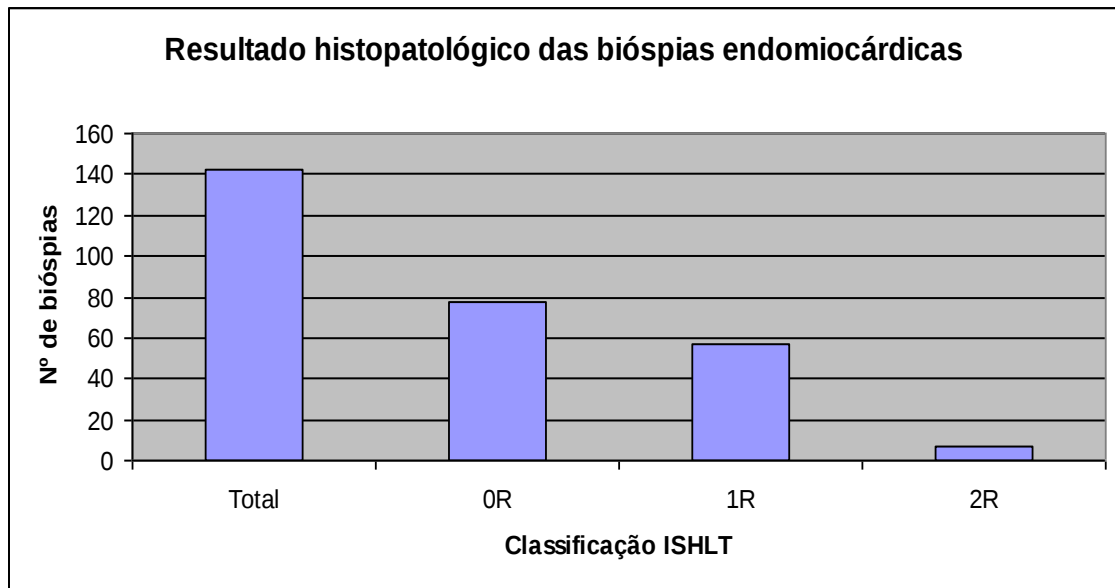


Figura 10- Resultado histopatológico das biópsias endomiocárdicas segundo a classificação ISHLT.

A relação temporal entre a realização de biópsia endomiocárdica com diagnóstico de rejeição (2R) e o tempo de transplante está ilustrada na Figura 11.

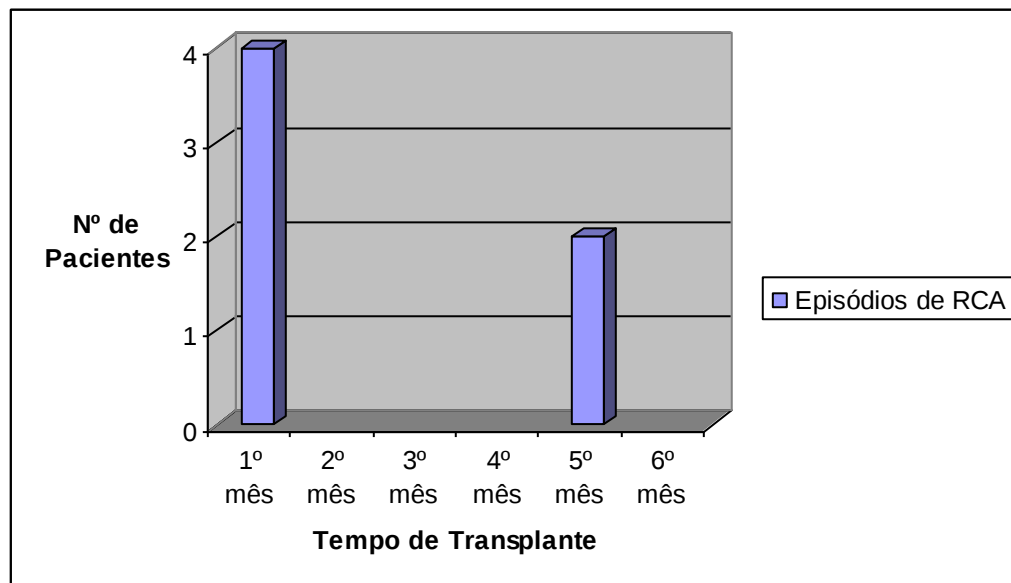


Figura 11- Gráfico com intervalo de tempo entre o transplante e o diagnóstico de RCA (rejeição celular aguda) classificada como 2R pela ISHLT.

A pesquisa de anticorpos *neoformados* foi realizada em 21 receptores (n=21), que estão em acompanhamento regular no INC. Os 4 (quatro) receptores não analisados já haviam falecido na ocasião da pesquisa, não sendo possível coletar

amostras para realização do exame. Em 4 (19%) receptores foi detectada presença de anticorpos *neoformados*. Observamos resultado positivo para HLA Classe I em 1(um) receptor e para HLA Classe II em outro. Quanto aos anticorpos para antígenos não HLA, detectamos um receptor positivo para Ac anti-MICA alelos 01, 04,12,18, 27 e Ac anti-MICA alelos 02,07,09,17,19. Outro receptor foi positivo apenas para Ac anti-MICA alelos 01,04,12,18, 27. Não foi realizada a tipagem de grupo alélico específico dos *neoanticorpos* Classe I e Classe II detectados. As características deste grupo estão resumidas na Tabela 9.

Tabela 9 Características dos pacientes que apresentaram *neo*-anticorpos após realização do transplante.

Receptor	Sexo	Idade	Raça	Tipagem sanguínea	MM	Data do TX	Doença de base	Antígeno
10	M	54	B	0	5	16/03/2009	D Chagas	MICA (2 grupos)
15	M	36	N	0	6	10/09/2010	C. Valvar	HLA classe II
18	M	56	B	B	5	10/04/2013	D. Chagas	MICA (1 grupo)
21	M	27	B	A	4	02/03/2012	C. Alcoólica	HLA classe I

Nenhum dos receptores que desenvolveram *neoanticorpos* apresentou diagnóstico de rejeição celular aguda de acordo com a análise das BEMs. A presença destes anticorpos se associa essencialmente à rejeição humoral (AMR), cujos critérios diagnósticos diferem do utilizado neste trabalho.

A amostra foi analisada de acordo com número de incompatibilidades entre as duplas de HLA-A + HLA-B + HLA-DR, de 0 a 6MM. Não houve casos de zero MM, 1MM ou 2 MM. A frequência de incompatibilidades entre o par doador x receptor foi: 2 com 3 MM (8%), 3 com 4 MM (12%), 12 com 5 MM (48%), 8 com 6 MM (32%). Quando individualizadas e de acordo com os diferentes *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DR, de 0 a 2 MM, encontrou-se a seguinte frequência de incompatibilidades: HLA-A : 9 com 1MM (36%), 16 com 2MM (64%); HLA-B: 7 com 1MM (28%),18 com 2MM

(72%);HLA-DR: 8 com 1MM (32%), 17 com 2MM (68%). Nenhum par com 0MM foi encontrado. As informações acima podem ser mais bem ilustradas na Tabela 10.

Tabela 10- Número de incompatibilidades HLA entre doadores e receptores.

Número de incompatibilidades HLA	
Nº alelos incompatíveis	Nº de pares: doador x receptor (n%)
HLA-A	
0	0(0%)
1	9(36%)
2	16(16%)
HLA-B	
0	0(0%)
1	7(28%)
2	18(72%)
HLA-DR	
0	0(0%)
1	8(32%)
2	17(68%)
Total (HLA-A + HLA-B + HLA-DR)	
3	2(8%)
4	3(12%)
5	12(48%)
6	8(32%)

O objetivo secundário foi pesquisar no soro de receptor, a presença de anticorpos *neoformados* anti-HLA e anti-MICA. Foi determinado o p-valor menor que 0,1 (10%) para provar a dependência entre as duas variáveis, rejeição e presença de anticorpos *neoformados*. Não encontramos significância estatística com relação

à presença de Ac anti HLA Classe I ($p=0,373$), Classe II ($p=0,373$), Ac anti-MICA 01,04,12,18,27 ($p=0,332$) ou Ac anti-MICA 01,07,09,17,19 ($p=0,369$).

Outros fatores foram associados à piora da sobrevida no transplante cardíaco, incluindo ou não um maior número de episódios de rejeição. Neste trabalho analisamos comparativamente estes fatores com a ocorrência de rejeição. Utilizamos os testes Qui-Quadrado, definindo o p-valor menor que 0,1(10%) como correlação estatisticamente significativa. Não houve correlação significativa em relação às seguintes variáveis: causa do óbito do doador ($p=0,409$), idade do receptor ($p=0,741$), Idade do doador ($p=0,194$), sexo do doador ($p=0,936$), sexo do receptor ($p=0,959$), raça do receptor ($p=0,815$), presença de viremia para CMV no receptor ($p=0,122$), tipagem sanguínea do receptor ($p=0,740$), tipagem sanguínea do doador ($p=0,287$), compatibilidade entre gênero do doador e receptor ($p=0,899$).

As variáveis categóricas analisadas estão descritas nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11 – Significância das variáveis analisadas em relação às características gerais da amostra.

Variáveis	P-valor (Significância)
Sexo do receptor	0,959
Idade do receptor (variável em classes)	0,741
Raça do receptor	0,815
Tipo Sanguineo do receptor	0,740
Presença de viremia para CMV no receptor	0,122
Idade do doador (variável em classes)	0,194
Tipo Sanguineo do doador	0,287
Causa do óbito do doador	0,409
Compatibilidade de tipo sanguíneo entre DxR	0,499

Tabela 12– Significância das variáveis analisadas com relação à incompatibilidade HLA.

Variáveis	P-valor (Significância)
HLA-A	0,412
HLA-B	0,478
HLA-DR	0,054
Total de incompatibilidades (todos HLAs)	0,541

Tabela 13– Significância das variáveis analisadas com relação à presença de *neoanticorpos*

Variáveis	P-valor (Significância)
Ac-anti HLA Classe I	0,373
Ac-anti HLA Classell	0,373
Ac anti-MICA : 01, 07, 09, 17,19	0,369
Ac anti-MICA : 01, 04, 12,18, 27	0,332

6. DISCUSSÃO

O transplante cardíaco (TX) é o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca (IC) refratária, constituindo-se não somente numa opção para aumentar a expectativa de vida, mas para oferecer melhor qualidade de vida ao paciente^{1,4}. O aumento da sobrevida se associa à exposição prolongada aos imunossupressores e complicações em longo prazo, tais como infecções, obesidade, hipertensão, insuficiência renal, diabetes, dislipidemia, neoplasias^{1,2,4,5}. O uso destas medicações deve ser criteriosamente avaliado e utilizado, evitando-se ao máximo o surgimento de complicações, sem, no entanto, permitir rejeição ao enxerto cardíaco⁶. Analisando os fatores associados ao maior risco de rejeição podemos individualizar o esquema imunossupressor, administrando a menor dose possível, sem perder a efetividade.

O esquema imunomodulador padronizado em nosso serviço segue as recomendações e protocolos internacionais.^{5,6,24} Tem como fundamento o uso de drogas com ação complementar, permitindo a administração de baixas dosagens e minimizando os efeitos colaterais, sem perda da eficácia. Esta combinação básica foi utilizada em todos os transplantes realizados, não havendo diferença entre os grupos com ou sem rejeição. O esquema compreende: um inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), um agente antiproliferativo (micofenolato de mofetil ou micofenolato de sódio) e corticosteróides. Não utilizamos de rotina a Terapia de Indução com anticorpos policlonais ou monoclonais, reservada apenas para pacientes com alto risco de rejeição e em casos específicos de insuficiência renal pré-transplante. Apenas um dos pacientes fez uso de indução com basiliximabe, por ser portador de amiloidose insuficiência renal. O mesmo apresentou um episódio de rejeição no 5º mês após o transplante.

Estudo multicêntrico incluindo 1190 pacientes de 27 diferentes centros transplantadores, encontrou correlação significativa entre o número de incompatibilidades HLA total (HLA- A, HLA-B e HLA- DR) com rejeição precoce, exceto em negros.¹⁵ Descreveu ainda fatores que aumentaram esta incidência cumulativamente: incompatibilidade HLA-DR, receptores jovens, doador ou receptor do sexo feminino e uso de indução.³¹ Em nossa casuística não encontramos significância estatística entre a rejeição nos primeiros 6 (seis) meses após TX e os

seguintes fatores associados: número de incompatibilidades HLA total (HLA- A, HLA-B e HLA- DR), idade do receptor ($p=0,53$), causa do óbito do doador ($p=0,36$), idade do doador ($p=0,470$), sexo do doador ($p=0,651$), sexo do receptor ($p=0,694$), raça do receptor ($p=0,657$), presença de viremia para CMV no receptor ($p=0,141$), tipagem sanguínea do receptor ($p=0,795$), tipagem sanguínea do doador ($p=0,145$) e compatibilidade entre gênero do doador e receptor ($p=0,847$). O uso de terapia de indução foi descartado para análise, pois não faz parte do protocolo utilizado no INC. Acreditamos que esta diferença estatística pode ter ocorrido graças ao surgimento de novas drogas imunossupressoras e técnicas de criopreservação. Houve uma redução na frequência de rejeição de maneira geral, o que tornaria tais variáveis insignificantes.

Enfatizamos que o aumento na frequência de rejeição está dissociado da redução na sobrevida. Alguns pesquisadores não encontraram significância estatística na sobrevida em longo prazo em relação à compatibilidade HLA entre doadores e receptores no transplante cardíaco, apesar da maior incidência de rejeição no primeiro ano após transplante ^{19,20}. Em nosso trabalho não foi avaliada a sobrevida, mas somente o número de episódios de rejeição nos primeiros 6 meses após transplante. Este período de tempo foi escolhido por ser o de maior incidência de RCA após transplante ^{4,5}.

No transplante renal a seleção do receptor ideal para o órgão doado é feita pela análise da incompatibilidade HLA e pela realização de prova cruzada pré-transplante. Estudos clínicos estabelecem neste tipo de transplante, uma maior frequência de rejeição, particularmente na incompatibilidade HLA-DR, que é utilizada como critério de seleção do melhor receptor. ^{8,9}. Nos transplantes cardíacos tal definição está ausente. ^{8,12} Por não ser utilizada como critério de seleção, não havia sido realizada tipagem HLA dos receptores transplantados entre os anos de 2008 e 2010.

Os critérios para seleção dos potenciais receptores para transplante cardíaco são: compatibilidade ABO doador x receptor; peso doador x receptor e tempo de espera ³. Para transplantes realizados em caráter de prioridade, o doador e o receptor devem respeitar apenas compatibilidade em relação ao sistema ABO ^{1,9,10}. Estes critérios foram utilizados em nosso Serviço, não havendo transplantes entre grupos sanguíneos incompatíveis.

Encontraram-se evidências de que no transplante cardíaco, a compatibilidade HLA-A, B e DR aumenta a sobrevida e reduz episódios de rejeição, em particular a incompatibilidade HLA-DR influenciando diretamente na frequência de episódios de rejeição nos primeiros meses após o transplante ¹³⁻¹⁸. Autores recomendam inclusive um esquema imunossupressor mais intenso nos pacientes com incompatibilidade HLA-DR ^{6,16}. Nosso estudo confirmou os resultados de trabalhos anteriores, encontrando correlação significativa entre incompatibilidade no alelo HLA-DR isoladamente e aumento de frequência de rejeição nos primeiros 6 (seis) meses após transplante ($p=0,054$).

A maior frequência de rejeição leva ao uso de esquema imunossupressor mais intenso, com aumento no risco de infecções e dos efeitos adversos associados a esta medicações. Observou-se também tendência para uma maior incidência de doença vascular do enxerto nos pacientes que apresentam episódios de rejeição. Apesar dos estudos divergirem quanto à importância da incompatibilidade HLA-DR a longo prazo, nos parece claro diante dos fatos acima descritos, que na prática clínica, há uma piora na evolução do paciente.

Diante de um número tão grande de possíveis combinações entre alelos HLA, fica fácil entender a dificuldade de se formarem pares ideais, com pequeno número de incompatibilidades. ^{21,22} O percentual de incompatibilidades entre alelos HLA-A, HLA-B e HLA-DR observado em nossa amostra foi compatível com o descrito na literatura. ¹⁷ Observou-se uma frequência maior de duplas com 5 MM (48%) seguida por duplas totalmente incompatíveis, com 6 MM (32%).

A dificuldade logística para realização de testes de compatibilidade entre doador e receptor no TX cardíaco, tendo em vista o tempo ideal entre captação e implante ser inferior a 4(quatro) horas, foi parcialmente superada. As atuais técnicas laboratoriais permitem hoje realizar a tipagem HLA e a pesquisa de anticorpos anti-HLA em até 2 (duas) horas, tempo hábil para realização de “crossmatch” entre doador e receptor ^{9,26-28}. Pela inexistência de consenso quanto à utilidade clínica da avaliação de compatibilidade HLA para seleção do receptor no TX cardíaco, este não é utilizado na prática diária e nem está incluído nos exames recomendados e, portanto, custeados pelo SUS. ^{8,12,18, 32,33,34}

Na rejeição ao enxerto cardíaco, a maioria dos pacientes inicialmente é assintomática, sendo necessária a realização de biópsias para detectar e tratar a rejeição antes que esta produza disfunção do enxerto sintomática ²⁴. Ela pode ser

classificada de acordo como o principal componente imunológico envolvido (humoral/celular)²³ Considera-se na verdade, tal classificação como didática, já que todo sistema imune atua em conjunto, embora uma das manifestações seja preponderante.

A rejeição celular aguda (RCA) é a mais frequente e tem critérios histológicos solidamente estabelecidos, por isso foi escolhida como padrão diagnóstico em nossa pesquisa. Como os critérios utilizados para diagnóstico de rejeição humoral não foram objeto deste estudo, estes foram eximidos de detalhamento. Foram considerados para o diagnóstico de RCA clinicamente significativa, as biópsias **2R** e **3R** pela Classificação ISHLT²⁵. Este critério foi utilizado por apenas nestes casos ser necessária intervenção terapêutica e, portanto, haver relevância na prática clínica.

Dos 25 receptores avaliados 6 (seis) apresentaram BEM 2R, sendo que um deles apresentou BEM 2R em duas ocasiões. Amostras 3R não foram encontradas. Aproximadamente 20% a 40% dos receptores de coração apresentará pelo menos um episódio de RCA no primeiro ano pós-operatório²⁴. Nosso estudo confirmou esta frequência, encontrando 24% de RCA na amostra estudada.

Nenhum dos receptores apresentava anticorpos anti-HLA para Classe I e Classe II (PRA negativo). A presença de anticorpos pré-formados comprovadamente aumenta a probabilidade de rejeição ao enxerto cardíaco, reduzindo a sobrevida e piorando o prognóstico. Encontram-se sob maior risco de sensibilização prévia as múltiparas, politransfundidos e pacientes com suporte circulatório.

A presença de *neo*anticorpos se associa essencialmente à rejeição humoral (AMR). Sua frequência é menos comum que a RCA, ocorrendo em cerca de 10% de pacientes que apresentam instabilidade hemodinâmica após transplante. Como objetivo secundário, pesquisamos a presença de anticorpos *neo*formados anti-HLA e anti-MICA no soro de receptor. Segundo os estudos há uma correlação direta entre a o surgimento de neoanticorpos e rejeição ao enxerto com piora da sobrevida.^{8,9,34,35} Não foi encontrada, entretanto, em nosso estudo, significância estatística com relação à presença de Ac anti-HLA Classe I ($p=0,396$), Classe II ($p=0,369$), Ac anti-MICA 01,04,12,18,27 ($p=0,293$) ou Ac anti-MICA 01,07,09,17,19 ($p=0,369$). Este resultado pode ser justificado. O diagnóstico de AMR se baseia na análise imuno-histoquímica da BEM, com a presença de imunoglobulina (IgG, IgM ou IgA), fragmentos do complemento (C3d, C4d, C1q) ou de células CD68 positivas

(macrófagos), bem como o aparecimento de neoanticorpos circulantes contra o HLA do doador ²⁴. Estes critérios diagnósticos para AMR não foram utilizados em nosso estudo. A amostra reduzida, acrescido do fato de a AMR ser considerada entidade rara, também torna esta informação pouco robusta.

A maioria dos receptores não apresentaram anticorpos anti-HLA e anti-MICA neoformados após transplante cardíaco.

Os receptores que desenvolveram *neoanticorpos* anti-HLA e anti-MICA não apresentaram sinais de rejeição celular aguda nas biópsias endomiocárdica realizadas.

O resultado deste trabalho sugere a utilização da compatibilidade HLA-DR como critério adicional para selecionar candidatos em fila de espera para transplante cardíaco. O menor risco de rejeição traz a possibilidade de se reduzir os níveis de imunossupressão nos casos de maior compatibilidade entre alelos HLA-DR. Com isso reduzimos a incidência de comorbidades, particularmente as infecções e neoplasias, melhorando não só a sobrevida, mas a qualidade de vida após a cirurgia.

6.1. Limitações do Estudo:

Não foi realizado a tipagem de grupo alélico dos *neoanticorpos* Classe I e Classe II detectados, o que impossibilitou comprovar a formação de antígenos HLA específicos contra o HLA do doador.

O estudo se limitou à avaliação da rejeição aguda celular. Para diagnóstico de rejeição humoral seria necessário realizar também a análise imuno-histoquímica em todas as biópsias endomiocárdicas.

O período de tempo analisado foi curto e não define se incompatibilidade HLA-DR interfere na evolução clínica, justificando um acompanhamento diferenciado nos casos de maior incompatibilidade.

A amostra reduzida não permite extrapolar os resultados para Transplantes Cardíacos fora do Instituto Nacional de Cardiologia, não sendo possível sugerir mudanças nas condutas atualmente estabelecidas.

7. CONCLUSÃO

Há correlação significativa entre incompatibilidade HLA-DR e maior número de episódios de rejeição celular aguda nos primeiros 6 (seis) meses após transplante cardíaco.

A maioria dos receptores não apresentaram anticorpos anti-HLA e anti-MICA *neoformados* após transplante cardíaco.

Os receptores que desenvolveram *neoanticorpos* anti-HLA e anti-MICA não apresentaram sinais de rejeição celular aguda nas biópsias endomiocárdica realizadas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- Bacal F, Souza-Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S, et al. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. Arq Bras Cardiol. 2009; 94(1 supl.1):p. e16-e73.
- 2- Registro Brasileiro de Transplantes. ABTO. Dimensionamento do Transplantes no Brasil e em cada Estado. Ano XVIII. Nº 5- 2006/2013.
- 3- Brasil, Portaria No- 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Diário Oficial (da Republica Federativa do Brasil). Brasília, 30 out. 2009. Seção 1, n. 208, p.77-120.
- 4- Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. Arq Bras Cardiol 2009;93(1 supl.1):1-71.
- 5- Lindenfeld J, Miller G, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, et al. Drug Therapy in the Heart Transplant Recipient Part I: Cardiac Rejection and Immunosuppressive Drugs. Circulation. 2004 Dez.; 110:3734-3740.
- 6- Lindenfeld J, Page RL, Zolty R, Shakar SF, Levi M, Lowes B, et al. Drug Therapy in the Heart Transplant Recipient Part III: Common Medical Problems. Circulation. 2005 Jan.; 111:113-117.
- 7- Abbas A B, Lichtman AH. Imunologia Celular e Molecular. 5.ed. São Paulo: Elsevier; 2005. Capítulos 5 e16; p: 65-81; 379-400.
- 8- Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. Transplantation. 2009 Jun 15;87(11):1681–8.
- 9- Família de KITs Labscreen para detecção de anticorpos HLA usando a tecnologia de Citometria de Fluxo. Biometrix. (on line). São Paulo, Brasil; 2014.(capturado 9 set.2014) Disponível em: <http://biometrix.com.br/>
- 10- Smith JD, Rose ML, Pomerance A, Burke M, Yacoub MH. Reduction of cellular rejection and increase in longer-term survival after heart transplantation after HLA-DR matching. Lancet 1995 Nov.; 346: 1318–22.
- 11- Protocolo do Serviço de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Instituto Nacional de Cardiologia. Rio de Janeiro; 2012.
- 12- Hosenpud JD, Edwards EB, Lin HM, Daily OP. Influence of HLA matching on thoracic transplant outcomes. An analysis from the UNOS/ISHLT Thoracic Registry.Circulation. Circulation 1996 Jul.; 94(2 Supp 15): 170-174.

- 13- Ketheesan N, Guan K. Tay, Campbell S. Witt, Frank T. The Significance of HLA Matching in Cardiac Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Mar.; 18: 226–30.
- 14- Suberbielle C, Dorent R, Vaissier E, et al. Influence of HLA matching on graft survival and incidence and severity of graft rejection in cardiac transplantation. *Transplant Proc*. 1994 Feb.;26(1): 245–6.
- 15- Jarcho J, Naftel DC, Shroyer TW, Kirklin JK, Bourge RC, Barr ML, et al. Influence of HLA mismatch on rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study. The Cardiac Transplant Research Database Group. *J Heart Lung Transplant*. 1994 Jul-Aug;13(4):583-95; discussion 595-6.
- 16- Kaczmarek I, Deutsch MA, Rohrer ME, Beiras-Fernandez A, Groetzner J, Daebritz S, et al. HLA-DR matching improves survival after heart transplantation: is it time to change allocation policies? *J Heart Lung Transplant*. 2006 Sep;25(9):1057-62.
- 17- Picascia A, Grimaldi V, Zullo A, Infante T, Maiello C, Crudele V, et al. Current concepts in histocompatibility during heart transplant. *Exp Clin Transplant*. 2012 Jun;10(3):209-18.
- 18- Aziz TM, Sheldon S, el-Gamel A, Krysiak P, Campbell C, Rahman A, et al. Implication of HLA mismatch in the clinical outcome of orthotopic heart transplantation. *Transplant Proc*. 1998 Aug; 30(5):1917-9.
- 19- Ranjit J, Rajasinghe HA, Itescu S, Surawalla S, Lietz K, et al. Long-term Survival After Cardiac Transplantation. *JACC*. 2001 Jan.; 37(1): 189–94;
- 20- Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999;1(3):334-42.
- 21- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010; 75:291-455
- 22- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database *Nucleic Acids Research*.2013; 41(D):1222-7.
- 23- Berry GJ, Angelini A, Burke MM, Bruneval P, Fishbein MC, Kobashigawa J. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: Evolution and current status (2005–2011). *International Society for Heart and Lung Transplantation*. 2011 Jun.; 30 (6):601-11.
- 24- Taylor D, Meiser B, Webber S, Baran DA, Carboni M, Dengler T, et al., The international society of heart and lung transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients Task Force 2: Immunosuppression and Rejection (Nov. 8, 2010)

- 25- Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. [Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection.](#) J Heart Lung Transplant. 2005 Nov;24(11):1710-20.
- 26- Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. Nephrology 2009; 14, 247–254.
- 27- Heinemann, FM. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. Transfus Med Hemother 2009; 36:273–278.
- 28- Família de KITS Labtype: Testes de tipagem HLA Classe I - Lócus A, B, C, e Classe II Lócus DR e DQ. Biometrix. (on line). São Paulo, Brasil; 2014. (capturado 9 set. 2014) Disponível em: <http://biometrix.com.br/>
- 29- Shahzad K, Aziz QA, Leva JP, Cadeiras M, Ho EK, Vlad G, et al. New-onset graft dysfunction after heart transplantation--incidence and mechanism-related outcomes. J Heart Lung Transplant. 2011 Feb; 30(2):194-203.
- 30- Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/12. Trata de pesquisas em seres humanos e atualiza a resolução 196. [Internet]. Diário Oficial da União. 12 dez. 2012 (acesso 13 jun. 2013). Disponível: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>
- 31- Kobashigawa, Jon et al. Report From a Consensus Conference on the Sensitized Patient Awaiting Heart Transplantation. J Heart Lung Transplant. 2009 Mar; 28(3): 213-225.
- 32- Lietz K, John R, Burke E, Kocher A, Schuster M, Suciu-Foca N, et al. Increased risk for cardiac allograft rejection in recipients with HLA-B8, DR3 type. Transplant Proc. 2001 Feb-Mar;33(1-2):481-2.
- 33- Almenar L, Maeso ML, Martínez-Dolz L, Rueda J, Palomar CG, Sáez AO, et al. Influence of HLA matching on survival in heart transplantation. Transplant Proc. 2005 Nov;37(9):4001-5.
- 34- Aydingoz SE, Takemoto SK, Pinsky BW, Salvalaggio PR, Lentine KL, Willoughby L, et al. The impact of human leukocyte antigen matching on transplant complications and immunosuppression dosage. Hum Immunol. 2007 Jun;68(6):491-9.
- 35- Kobashigawa, Jon et al. Report From a Consensus Conference on the Sensitized Patient Awaiting Heart Transplantation. J Heart Lung Transplant. 2009 Mar; 28(3): 213-225.

9. Anexos

9.1. Anexo A

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO A SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO PARA USO DE PRONTUÁRIOS

Título do Estudo:

Investigador Principal:

Declaro, para os devidos fins, que Ligia Beatriz Chaves Espinosa Schtruk, Tereza Cristina Fellipe Guimarães e Luis Cristóvão Pôrto, teremos compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes, os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto: “Compatibilidade HLA entre doador e receptor nos transplantes cardíacos realizados no Instituto Nacional de Cardiologia”. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, que deverá ser submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP. Tenho ciência que o Serviço de Arquivo Médico somente poderão liberar dados para fins de pesquisa científica para projetos “aprovados”, com a devida autorização pelo Membros do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/INC.

Rio de Janeiro, de de 20..... .

9.2. Anexo B

Serviço Público Federal
Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção a Saúde
Instituto Nacional de Cardiologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a)

Sr(a). _____
para participar do Projeto de Pesquisa “**Compatibilidade HLA entre doador e receptor nos transplantes cardíacos realizados no Instituto Nacional de Cardiologia**”, que será realizado no Instituto Nacional de Cardiologia.

A pesquisa pretende avaliar a presença de novos anticorpos anti-HLA, que são proteínas específicas produzidas pelo sistema de defesa do seu organismo, após a realização do transplante de coração.

A pesquisadora Dra. Ligia Espinosa Schtruk, responsável pelo projeto, pede autorização para coletar (tirar) uma amostra de seu sangue (dez mililitros), para poder fazer esta pesquisa.

O Sr.(a) foi escolhido porque foi submetido a transplante cardíaco. A informação do seu exame vai servir para avaliarmos se a presença de anticorpos anti-HLA tem relação com a frequência de rejeição ao coração transplantado. O sangue que não for usado não será guardado, sendo descartado com todo o cuidado. A coleta do sangue será feita em uma veia de seu braço, podendo causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor acompanhamento dos pacientes submetidos a transplante cardíaco e de como podem ser identificados casos com maior chance de rejeição do coração transplantado. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a elaboração da pesquisa, entre em contato com a pesquisadora responsável, Dra Ligia Espinosa Schtruk, **Serviço de Insuficiência Cardíaca e Transplante, Instituto Nacional de Cardiologia (INC), Rua das Laranjeiras, 374, 7º and, CEP: 22240-006. Telefone: 3037-2400 ou pelo e-mail: ligiaschtruk@yahoo.com.br.**

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Assinatura do participante:

Data ____ - ____ - ____

