

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EDUARDO AUGUSTO CALDEIRA STORTI

EXPRESSÃO TECIDUAL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO (ADAM 28 E ADAM 33), DE INTERLEUCINAS (6, 8, 10, 17) E DE CD3, CD4, CD8 E CD20, EM AMOSTRAS PULMONARES DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE REALIZARAM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA E FORAM A ÓBITO.

CURITIBA

2018

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EDUARDO AUGUSTO CALDEIRA STORTI

EXPRESSÃO TECIDUAL DE MOLÉCULAS DE ADESÃO (ADAM 28 E ADAM 33), DE INTERLEUCINAS (6, 8, 10, 17) E DE CD3, CD4, CD8 E CD20, EM AMOSTRAS PULMONARES DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE REALIZARAM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA E FORAM A ÓBITO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Lúcia de Noronha

CURITIBA

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR

S886e
2018 Storti, Eduardo Augusto Caldeira
Expressão tecidual de moléculas de adesão (adam 28e adam 33), de interleucinas (6, 8, 10, 17) e de cd3, cd4, cd8 e cd20, em amostras pulmonares de pacientes com anemia de Fanconi que realizaram transplante de medula óssea e foram a óbito / Eduardo Augusto Caldeira Storti ; orientador: Lúcia de Noronha.– 2018.
58 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2018
Bibliografias: 52-55

1. Anemia de Fanconi. 2. Interleucinas. 3. Moléculas de adesão celular. 4. Pneumopatias. 5. Transplante de medula óssea. I. Noronha, Lúcia de. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610



**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Ao primeiro dia do mês de agosto de 2018 às 13hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **“EXPRESSÃO TECIDUAL DE INTERLEUCINAS EM AMOSTRAS PULMONARES DE PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE REALIZARAM TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E FORAM A ÓBITO”** apresentado por **Eduardo Augusto Caldeira Storti** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lucia de Noronha – Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza – (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Percicote (UFPR)	Ana Paula Percicote

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lucia de Noronha

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Cleber Machado de Souza

Conceito: Aprovado

Profa. Dra. Ana Paula Percicote

Conceito: Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

- fazer correções da banca
- fazer o artigo

Profa. Dra. Lucia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

Durante essa caminhada, muitas pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse até aqui.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Agradeço a minha orientadora, professora Lúcia de Noronha, a quem aprendi e repartí seu tempo e conhecimento, pelo apoio e pela aposta.

Agradeço à doutora Carmen Bonfim pelas incontáveis ajudas na pesquisa.

Agradeço às famílias dos pacientes por terem aberto seus corações e suas memórias, sem as quais não conheceríamos a matéria-prima para a pesquisa.

Agradeço a minha esposa, Wanessa, cuja iniciativa e incentivo foram fundamentais para que eu começasse e prosseguisse nesta caminhada. Agradeço a ela e a meus filhos, não faz sentido caminhar sem dar a mão para vocês. A minha mãe, que sempre esteve ao meu lado. A meu pai, que está sempre em meu coração sentindo orgulho de mim. Sem eles, esse projeto não teria sentido.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes
e seus familiares, sem eles, nada disso
existiria.

RESUMO

Introdução: A anemia de Fanconi (AF) é uma rara doença genética autossômica recessiva ou ligada ao X, associada a anomalias congênitas, com insuficiência progressiva de medula óssea e aumento do risco para leucemia e outros tipos de câncer. O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) tem sido indicado nos pacientes com AF com doença grave e com transformações leucêmicas ou síndrome mielodisplásica, além de ser utilizado como tratamento para diversas doenças hematológicas. Entretanto, as complicações pulmonares podem ocorrer em até 60% dos pacientes sendo o principal motivo de falha no tratamento. Nesse trabalho, busca-se entender esse processo em indivíduos não imunocompetentes, e permitir o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais adequadas através do estudo da expressão imunohistoquímica. Ela pode variar entre os pacientes dependendo do tipo de complicação infecciosa ou não, origem das células transplantadas e do condicionamento que o paciente realizou.

Objetivos: avaliar a expressão tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e o número de subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares de pacientes com anemia de Fanconi que foram a óbito.

Método: foram selecionados 24 casos de necropsias pediátricas em pacientes com anemia de Fanconi que tinham sido submetidos a TCTH. Utilizamos a técnica de imunohistoquímica para avaliar as metaloproteinases (ADAM28 e ADAM33) e as citocinas inflamatórias (IL6, IL8, IL10, IL17) e os linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 nas amostras pulmonares parafinadas. A faixa etária dos pacientes variou entre 5 a 17 anos de idade, sendo 13 femininos e 11 masculinos

Resultados: a amostra foi caracterizada segundo seus dados demográficos revelando uma população predominantemente branca, com altas taxas de transfusão pré-transplante e com um índice de Karnofsky/Lansky (performance) pré-transplante bom. Os dados clínicos revelaram presença de altas taxas de complicações infecciosas, DECH e complicações pulmonares hemorrágicas. A expressão imunohistoquímica tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e a contagem dos subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares parafinadas destes pacientes foi realizada, revelando altas taxas de expressão de interleucinas e baixas contagens de linfócitos.

Conclusão: Os resultados deste estudo demonstraram que há uma expressão tecidual de interleucinas, moléculas de adesão e contagem de linfócitos CD8 mais elevados nas amostras dos pacientes onde foram encontrados padrão anatomopatológico infeccioso, seja por vírus, bactéria ou fungo com $p = 0,03$. Aqueles pacientes sem infecção bacteriana tiveram valores mais baixos de ADAM33, com um valor de p de 0,016. Os pacientes sem infecção fúngica apresentaram valores maiores de IL8, com um valor de p de 0,004.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi, transplante de medula óssea, interleucinas, linfócitos, moléculas de adesão, complicações pulmonares.

ABSTRACT

Introduction: Fanconi anemia (AF) is a rare autosomal or X-linked genetic disorder associated with congenital anomalies, with progressive bone marrow insufficiency and increased risk for leukemia and other types of cancer. The hematopoietic stem cell transplant (HSCT) has been indicated in patients with AF with severe disease and with leukemic transformations or myelodysplastic syndrome, besides being used as treatment for several hematologic diseases. However, pulmonary complications can occur in up to 60% of patients being the main cause of failure in treatment. In this work, we seek to understand this process in non-immunocompetent individuals, and to allow the development of more appropriate therapeutic approaches through the study of the immunohistochemical expression. It can vary between patients depending on the type of infectious complication or not, the origin of the transplanted cells and the conditioning that the patient performed.

Objectives: To evaluate the tissue expression of adhesion molecules (ADAM 28 and 33), Interleukins (6, 8, 10 and 17) and the number of subtypes of TCD3 lymphocytes, CD4, CD8 and BCD20 lymphocyte in pulmonary samples of patients with Fanconi anemia which were death.

Method: 24 Cases of pediatric necropsies were selected in patients with Fanconi anemia who had undergone HSCT. We use the technique of immunohistochemical to evaluate the metalloproteinases (ADAM28 and ADAM33) and the inflammatory cytokines (IL6, IL8, IL10, IL17) and the lymphocytes TCD3, CD4, CD8 and lymphocyte BCD20 in the pulmonary specimens. The age range of patients ranged from 5 to 17 years of age, 13 female and 11 male

Results: The sample was characterized according to its demographic data revealing a predominantly white population, with high rates of transfusion transplant and with an index of Karnofsky/Lansky (performance) transplant good. Clinical data revealed high rates of infectious complications, DECH and hemorrhagic pulmonary complications. The expression immunohistochemical tissue of adhesion molecules (ADAM 28 and 33), Interleukins (6, 8, 10 and 17) and the count of the subtypes of TCD3 lymphocytes, CD4, CD8 and BCD20 lymphocyte in pulmonary samples of these patients was performed, revealing high expression rates of interleukins and low lymphocyte counts.

Conclusion: The results of this study demonstrated that there is a tissue expression of interleukins, adhesion molecules and higher CD8 lymphocyte count in patients' samples where infectious pathology pattern was found, whether By virus, bacterium or fungus with $P = 0.03$. Those patients without bacterial infection had lower values of ADAM33, with a value of P of 0.016. Patients without fungal infection presented higher values of IL8, with a value of P of 0.004.

Key words: Fanconi Anemia, bone marrow transplant, interleukins, lymphocytes, adhesion molecules, lung complications.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO GERAL.....	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4. MATERIAL E MÉTODO	26
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - COMPLICAÇÕES PULMONARES EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA	21
QUADRO 2 - TEMPO APROXIMADO DE INÍCIO DAS MAIORES COMPLICAÇÕES APÓS TMO	21
TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES DO ESTUDO	30
TABELA 2 - DADOS CLÍNICOS RELATIVOS AO TIPO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, CONDICIONAMENTO E PROFILAXIA REALIZADA NOS PACIENTES DO ESTUDO	31
TABELA 3 - DADOS CLÍNICOS RELATIVOS ÀS COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES DO ESTUDO NO PÓS TRANSPLANTE.....	32
TABELA 4 - DADOS DE EXPRESSÃO DÀS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS.....	34
TABELA 5 - DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS POR PACIENTE DO ESTUDO ALÉM DE DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS PULMONARES	35
TABELA 6 - DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS EM RELAÇÃO AOS DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES	36
TABELA 7 - DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS EM DIFERENTES CONDICIONAMENTOS PRÉ TMO	37
TABELA 8 - DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS DE ACORDO COM A IMUNOPROFILAXIA PÓS TMO	38
TABELA 9 - COMPLICAÇÕES PULMONARES INFECCIOSAS E NÃO-INFECCIOSAS NAS AMOSTRAS PULMONARES DOS PACIENTES DO ESTUDO SOB O PONTO DE VISTA CLÍNICO	39
TABELA 10 - CORRELACIONA A INCOMPATIBILIDADE HLA DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCIAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS	40

TABELA 11 - CORRELACIONA O TIPO DE CONDICIONAMENTO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS	41
TABELA 12 - CORRELACIONA A ORIGEM DAS CÉLULAS DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS	42
TABELA 13 - CORRELACIONA A PRESENÇA DE INFECÇÃO BACTERIANA NOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS	43
TABELA 14 - CORRELACIONA A PRESENÇA DE INFECÇÃO FÚNGICA NOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS	44
TABELA 15 - CAUSAS DE ÓBITO DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE FORAM SUBMETIDOS A TMO	45
TABELA 16 - CORRELACIONA A SOBREVIDA DOS PACIENTES DO ESTUDO COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS AVALIADAS	46

1 INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética associada a diversas anomalias congênitas, com insuficiência progressiva de medula óssea e aumento do risco para leucemia e outros tipos de câncer. É uma rara doença autossômica recessiva ou ligada ao X, constituindo a causa herdada mais frequente de aplasia da medula óssea (AMO). Seus genes são denominados FANC e, até o momento, foram identificados 15 genes da anemia de Fanconi. Desses, 14 são genes autossômicos e apenas um localiza-se no cromossomo X (gene FANCB). As mutações nesses diferentes genes levam a heterogeneidade genética e fenotípica da doença, que resultam em produtos mutantes envolvidos nas vias de reparo do DNA. Um de seus genes, o gene FANCD1, é idêntico ao gene BRCA2 – este um dos genes de predisposição aos cânceres hereditários de mama e ovário (SOULIER, 2011).

O transplante de medula óssea (TMO) tem sido utilizado como tratamento para diversas doenças hematológicas. Entretanto, as complicações pulmonares, que podem ocorrer em até 60% dos pacientes, são o principal motivo de falha no tratamento. As complicações pulmonares pós-TMO podem ser divididas de acordo com a imunidade do paciente. Estas complicações pulmonares diferem daquelas que afetam os pacientes imunocompetentes, principalmente no que tange a indução de respostas pró-inflamatórias. Nesse trabalho, busca-se entender esse processo em indivíduos não imunocompetentes, transplantados de medula óssea, a fim de ajudar no melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças e permitir o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais adequadas.

As complicações respiratórias em pacientes transplantados de medula óssea representam uma causa importante de morbimortalidade, sendo divididas em três fases de acordo com a imunidade do paciente. Na primeira fase, até 30 dias após o procedimento, predominam as complicações não infecciosas e as pneumonias fúngicas. Na fase precoce que vai até cem dias pós TMO, as infecções virais, principalmente por citomegalovírus, são mais comuns. Por último, na fase tardia pós TMO, complicações não infecciosas como bronquiolite obliterante com pneumonia em organização e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) são mais comumente observadas.

O padrão de expressão das citocinas pode variar entre os pacientes dependendo do tipo de complicação respiratória e de sua imunidade. A medida dos níveis de citocinas no pós-transplante, além de desvendar a participação destas na DECH, permite conhecer a imunopatogênese da doença e possibilita prever episódios da mesma. Vários estudos de acompanhamento da produção de citocinas no pós-transplante de células progenitoras têm demonstrado um aumento de citocinas inflamatórias ou de seus receptores no soro de pacientes com DECH.

Conhecer melhor a resposta imunológica de pacientes imunossuprimidos poderia auxiliar no diagnóstico mais preciso das complicações pulmonares destes pacientes, com instituição de terapêuticas mais precisas, evitando agravamentos e minimizando as taxas de morbimortalidade, diminuindo tempo de internação e consequentemente custos sociais e econômicos ao sistema de saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a expressão tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e o número de subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares de pacientes com anemia de Fanconi que foram a óbito por pneumopatia grave.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização das amostras estudadas de acordo com o gênero, faixa etária e padrão histopatológico da doença;
- Realizar a caracterização da amostra quanto aos dados clínicos relevantes;
- Realizar uma avaliação da expressão imunohistoquímica tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e a contagem dos subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares parafinadas destes pacientes.

- Comparar a expressão tecidual e a contagem de subtipos de linfócitos com os achados anatomopatológicos e clínicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A ANEMIA DE FANCONI (AF)

Descrito pela primeira vez pelo suíço Guido Fanconi em 1927, os pacientes da AF apresentam como características: um largo espectro de anomalias congênitas, aplasia da medula óssea (AMO), predisposição à malignização hematológica e sólida e, também, presença de quebras cromossomais espontâneas e induzidas (SCHIFFERLI 2015). Guido Fanconi descreveu a história de três irmãos portadores de uma anemia grave e fatal, sendo que todos os três tinham entre cinco e sete anos de idade e apresentavam um desenvolvimento intelectual normal, microcefalia, hiperpigmentação da pele, hemorragia cutânea, hipoplasia genital, estrabismo e uma anemia progressiva. Na busca para encontrar a causa desta doença, os cientistas da época depararam-se com inúmeras quebras e aberrações cromossômicas e concluíram que os pacientes com AF sofriam de uma síndrome de instabilidade cromossômica (FANCONI, 1967).

A AF acomete 1: 360.000 nascidos vivos e geralmente é herdada de maneira autossômica recessiva (CROSSAN; PATEL, 2012). A frequência dos heterozigotos de 1:300 foi estimada há mais de 40 anos atrás sendo baseada em dados superficiais e limitada pela raridade do diagnóstico na época. (ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011). No Brasil, não há relatos específicos sobre a incidência desta doença. Devido à grande variabilidade da doença, é provável que a verdadeira incidência da AF seja muito subestimada.

As manifestações clínicas variam entre pacientes da AF tanto na sua apresentação quanto na severidade. Muitas vezes – mas nem sempre – a doença se manifesta por meio de uma combinação de várias anormalidades congênitas como estatura baixa, fácies de Fanconi, microftalmia, deformidades dos dedos e do rádio, manchas cutâneas café com leite e malformações cardíacas, renais,

genitourinárias e outras. Anormalidades físicas podem ser ausentes ou sutis (SOULIER, 2011).

Existem vários estágios clínicos da doença relacionados com a idade. Ao nascer e nos primeiros anos de vida, apenas sinais físicos estão presentes e podem ser discretos ou extensos. Entre as idades 5-15, muitos pacientes apresentam AMO e é nessa fase que a AF é frequentemente diagnosticada. Já na adolescência e início da vida adulta, o risco de leucemia mielóide aguda (LMA) e de síndrome mielodisplásica (SMD) é alto. E na vida adulta, variados tipos de câncer podem ser vistos, especialmente câncer de boca (SOULIER, 2011).

Por conta das falhas nas vias de reparo do DNA, níveis de apoptose estão aumentados em todo o sistema hematopoiético resultando em perda de células tronco hematopoiéticas. Dessa forma, a primeira manifestação é a trombocitopenia, seguida por neutropenia e anemia (Epanchintsev, 2015). Também é comum observar anormalidades citogenéticas como monossomia 7 e duplicação do 1q antes mesmo da manifestação de LMA ou SMD (SCHIFFERLI, 2015).

A etiologia da AMO na AF não está clara, mas evidências apontam para a hipersensibilidade das células da medula óssea destes pacientes para citocinas pró-apoptóticas, como TNF- α que se encontra superproduzida (EPANCHINTSEV, 2015).

Muitos dos pacientes desenvolvem AMO durante a primeira e segunda décadas de vida, e para a maioria dos pacientes, a suspeita de AF só será feita após o começo da pancitopenia. Já para outros pacientes, o diagnóstico só é feito quando a LMA OU SMD estabelecem-se (SOULIER, 2011).

Na AF há aumento da hemoglobina fetal e da α -feto proteína sérica, sendo que a macrocitose também é comum, porém, a ausência desses aumentos não exclui o diagnóstico. Esses marcadores não são específicos da AF, mas podem ajudar a diferenciar entre AMO herdada e não herdada. Existe também uma fração significativa de pacientes que não desenvolvem evidente AMO, mas ainda assim são suscetíveis a risco de malignização.

Pelo perfil propenso à malignizações e a necessidade de manter uma vigilância para cânceres ao longo da vida, todas as crianças e jovens adultos com anemias hipoplásicas ou aplásicas, com citopenias e com LMA ou SMD acompanhados de sinais físicos e/ou anormalidades cromossomais na MO

relacionadas à AF (como 1q+ ou 3q+) devem realizar o screening para esta doença (SOULIER, 2011).

Na maioria dos casos, um diagnóstico preciso é obtido por meio de anamnese, exame físico e teste sanguíneo de quebra cromossômica positivo. O diagnóstico biológico da AF é primariamente baseado na sensibilidade das células destes pacientes a químicos clastogênicos como diepoxibutano (DEB) e mitomicina C. Dessa forma, realiza-se o teste de quebras cromossômicas com esses agentes como padrão de diagnóstico da AF (SOULIER, 2011).

Outros testes sanguíneos incluem análise do ciclo celular e avaliação do FANCD2 monoubiquitinizado, que diagnostica positivamente a AF. Contudo, esses testes podem ser ambíguos ou falso-negativos em pacientes que desenvolvem reversão hematopoiética e mosaicismo somático. Como alternativa para esses falso-negativos, realiza-se o teste de quebra cromossômica, curvas de crescimento ou teste de FANCD2 nos fibroblastos primários da pele (por não existir evidência de que essas células sofram reversão hematopoiética ou mosaicismo somático). Após o diagnóstico celular da AF, pode-se realizar o screening para os genes FANC (SOULIER, 2011).

O diagnóstico correto da AF é essencial, pois pacientes com esta doença não respondem à terapia imunossupressora – indicada para a anemia aplásica idiopática. Esses pacientes também são hipersensíveis a agentes quimioterápicos. Dessa forma, não podem receber a dose convencional de condicionamento para o TMO, pois irão a óbito por toxicidade. Assim, regimes menos mieloablativos são usados nessa população (SOULIER, 2011).

Existem terapias de suporte para a AMO relacionada à AF, que consistem em andrógenos, fatores de crescimento hematopoiético e produtos do sangue. Contudo, o TMO ainda representa a única terapia curativa para a AMO (EPANCHINTSEV, 2015).

3.2 O TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA (TMO) EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI (AF)

São três as modalidades de transplante de medula óssea: (a) transplante alogênico, em que o paciente recebe a medula de uma outra pessoa, que pode ser algum familiar (doador aparentado) ou não (doador não aparentado); (b)

transplante singênico, em que o doador é um irmão gêmeo idêntico. É a modalidade mais rara de transplante devido à pouca frequência de gêmeos idênticos na população e; (c) transplante autogênico (ou autólogo), que utiliza as células do próprio paciente coletadas previamente. Foi empregado pela primeira vez no final da década de 70 para tratar pacientes adultos com linfoma.

Inicialmente, o TMO - atualmente chamado de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) - era considerado último recurso terapêutico, usado apenas para resgate de pacientes que receberam doses supraletais de radio e quimioterapia. Atualmente, o TMO alogênico é indicado para diversas doenças, como primeira linha ou não, dentre elas, neoplasias sólidas e hematológicas, hemoglobinopatias, doenças inatas do metabolismo e síndromes hereditárias de insuficiência medular, como a AF (GYURKOCZA et al., 2010).

Atualmente, o único tratamento com perspectiva de cura hematológica é o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH). Este procedimento é indicado quando o paciente apresenta queda progressiva dos índices hematológicos e, deve ser realizado, de preferência, antes que a primeira transfusão ocorra, pois as transfusões pioram o prognóstico, aumentando o risco de rejeição pela aloimunização e pelo acúmulo de ferro no organismo dos pacientes (BONFIM, 2014).

Outra modalidade de transplante que pode ser feita é aquela realizada com o sangue do cordão umbilical (SCU). Depois da realização do primeiro transplante com SCU, essa fonte de células passou a ser melhor estudada, primeiro com doadores relacionados e, posteriormente, com doadores não relacionados. O SCU possui propriedades muito interessantes como a menor probabilidade de induzir DECH aguda e crônica, mesmo quando a tipagem HLA não é totalmente compatível com a do receptor. O SCU aparentemente mantém o efeito do enxerto contra leucemia e propicia um menor índice de infecções por vírus como EBV e CMV. Isso fez com que, a partir de 1992, o SCU passasse a ser sistematicamente congelado com a criação do Placental Blood Program pelo Dr. Pablo Rubenstein no New York Blood Center. Desde então vários centros passaram a estocar SCU congelado para a realização de transplantes. Isso também passou a ser uma vantagem, pois as unidades de SCU podem ser enviadas para qualquer lugar do mundo com relativa rapidez. (CASTRO JR, GREIANIN, BRUNETTO, 2001).

As indicações para o TMO em pacientes com AF geralmente são de doença grave tais como hemoglobina, plaquetas ou neutrófilo abaixo de um certo nível crítico, transformação leucêmica ou síndrome mielodisplásica (DALLE & LATOUR, 2016). Mas, novos estudos mostraram que o TMO precoce está associado a melhores resultados, desde menor desenvolvimento de resistência a menos danos da quimioterapia (passando por complicações como falha de pega do enxerto, infecções oportunistas e DECH aguda e crônica), além do uso de técnicas como doses reduzidas de ciclofosfamida e fludarabina, de radiação, depleção de células T do enxerto e até o abandono da irradiação corporal total (Shimamura & Alter, 2010) (MACMILLIAN, 2015).

Por isso, um médico tratando de pacientes com AF precisa ter grande conhecimento de todas as intercorrências da doença e de seu tratamento, principalmente infecções, tanto pulmonares quanto gastrointestinais, genitourinárias ou disseminadas após TCTH. Além disso, ele precisa saber que apesar da cura hematológica proporcionada pelo TCTH, a AF é uma doença sistêmica e todos os pacientes necessitam de acompanhamento médico por toda a vida, independente do tratamento recebido. O aumento da sobrevida de pacientes com AF também evidenciou uma série de complicações tardias relacionadas à doença de base e terapias empregadas que precisam ser melhor compreendidas (BONFIM, 2014).

3.3 AS COMPLICAÇÕES PULMONARES DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O TMO é uma terapia efetiva para os portadores de AF e as complicações pós-transplante ocorrem em menor quantidade em pacientes mais jovens, com plaquetas elevadas (GLUCKMAN et al., 1995).

Alguns dos agentes quimioterápicos utilizados no condicionamento na fase anterior ao TMO, como bleomicina, busulfan e ciclofosfamida, estão associados à toxicidade pulmonar (MICHELSON et al., 2007). Além disso, a quantidade de irradiação corporal total, administrada no período de condicionamento pré-transplante mieloablativo, está relacionada a um aumento nas chances de desenvolvimento da síndrome da pneumonia idiopática. (ABUGIDEIRI et al., 2015).

Após o regime de condicionamento, ainda no pré-transplante, as imunidades humoral e celular são totalmente eliminadas, deixando o paciente vulnerável a qualquer infecção oportunista. Em primeiro momento, a quebra da barreira mucocutâneo e a neutropenia favorecem o aparecimento de infecções oportunistas. Mesmo após a recuperação granulocítica no pós-TMO, as imunidades celulares T e B ainda estão comprometidas. Um pequeno grau de imunidade celular oriunda do doador, principalmente das células tronco mobilizadas periféricamente, é transferida, sendo, porém, perdido com a imunossupressão. A imunidade celular B não é transferida. Após os primeiros 3 meses de TMO, as células B já estão presentes e iniciando suas atividades. EM seguida são os linfócitos TCD3⁺ e TCD8⁺. Os linfócitos TCD4⁺ com 9 meses são recuperados. A última função a ser recuperada é a imunidade humoral, que é dependente da função T, que estimula a produção de anticorpos (MACHADO et.al., 2009). É importante notar que parte da imunidade do doador pode ser transferida para o receptor, a chamada imunoterapia adotiva. A recuperação imunológica é progressiva, mas pode ser atrasada com a ocorrência de DECH crônica. Ela ocorre em até 50% dos pacientes que sobrevivem seis meses ou mais após TMO. (GASPARETTO et.al., 2005; MANCUSO, REZENDE, 2006).

A Doença do Enxerto contra o Hospedeiro - DECH -, uma importante complicação pós-transplante e que pode afetar os pulmões, é uma entidade clínica que resulta do ataque imunológico por parte das células imunocompetentes do doador contra os tecidos do receptor, reconhecidos como estranhos. Ocorre, geralmente, após o transplante alogênico de medula óssea (FLOWERS et. al., 1999). Classicamente, a DECH é dividida em aguda e crônica com base no tempo de apresentação. A DECH aguda ocorre nos 100 primeiros dias após TMO e a DECH crônica ocorre após os 100 dias de pós-TMO. Atualmente, essa divisão tem sido considerada artificial, e estudos atuais apontam para a utilização das manifestações clínicas para classificar melhor essas entidades (FILIPOVICH et.al., 2005). Estão sendo realizados cada vez mais transplante autólogos em detrimento dos alogênicos. Os transplantes autólogos reduzem o risco de desenvolvimento da DECH e evitam um uso maior da imunossupressão durante os transplantes (MICHELSON et al., 2007). Não estão, entretanto, livres de complicações (AFESSA et al., 2012). O condicionamento feito pré-transplante com o uso de ciclosporina diminui o risco de ocorrer DECH. (GLUCKMAN et. al., 1995). No estudo realizado

no Hospital das Clínicas da UFPR, no período de outubro de 1979 a dezembro de 1992, foram avaliados vinte pacientes portadores de AF submetidos ao TMO. Após o transplante, 11 apresentaram sobrevida maior que cem dias e, deste grupo, 5 evoluíram para DECH crônica. (FRARE E SILVA, 1996).

As complicações pulmonares após TMO, podem ser classificadas em infecciosas ou não-infecciosas, sendo que ocorrem em 25-50% dos transplantados e, estão associados com altas taxas de morbimortalidade (VIDE QUADRO 1). O avanço no diagnóstico e manejo das complicações infecciosas pulmonares levou a um aumento no número de complicações não-infecciosas. (PANDYA; SOUBANI, 2010). A insuficiência respiratória aguda contribui significativamente para a mortalidade recorrente após o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (ELBAHLAWAN et.al., 2016).

No pré-transplante, o sistema imunológico encontra-se comprometido por conta da neutropenia, característica dessa fase. Durante esse período, as infecções pulmonares infecciosas predominam, especialmente as bacterianas. Bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas spp.*, são um dos patógenos mais comuns nessa fase, mas outras bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus viridans* e *Enterococcus spp.*, também podem ser encontradas. (MICHELSON et al., 2007). Infecções fúngicas por *Candida* e, ocasionalmente, *Aspergillus spp.*, podem estar presentes. Pacientes soropositivos para *Herpes simplex virus* (HSV) podem desenvolver a infecção viral ativa após o TMO, podendo causar tanto broncopneumonia quanto pneumonite intersticial difusa. (MICHELSON et al., 2007).

Dentre as complicações pulmonares não-infecciosas do pós-transplante, temos o edema pulmonar, a síndrome do distress respiratório perienxerto, e a síndrome da pneumonia idiopática, caracterizada por dispneia, tosse não produtiva e hipoxemia. Também temos a doença pulmonar veno-oclusiva, que se apresenta como uma forma de hipertensão pulmonar, com sinais de insuficiência cardíaca direita, dispneia e infiltrados pulmonares nas radiografias torácicas. Nessa doença, pequenas veias e vênulas são parcialmente ou totalmente ocluídas devido à fibrose e, dos pacientes que se submetem a transplante de medula óssea, crianças são as mais acometidas por esta complicação pulmonar (MICHELSON et al., 2007).

Outras complicações pulmonares não-infecciosas pós-transplante têm manifestação mais tardia e podem ocorrer até 3 meses após o TMO, como a

bronquiolite obliterante (BO). A BO é uma doença pulmonar obstrutiva crônica irreversível na criança caracterizada por inflamação subepitelial e estreitamento fibrótico dos bronquíolos (YU, 2015). É predominantemente neutrofílica com elevados índices de citocinas pró-inflamatórias (IL1B, IL6, IL8, TNF-a e NFKB). Pode estar associada à DECH e tem como quadro clínico dispneia, sibilos e tosse não produtiva. O diagnóstico de certeza é feito por exame anatomopatológico de fragmentos obtidos de biópsia pulmonar. (RIBEIRO; FISCHER, 2015).

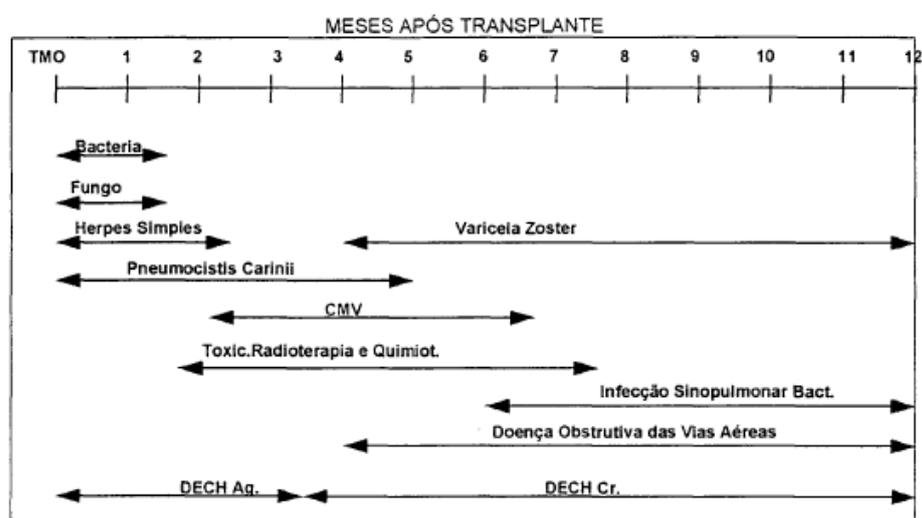
As complicações pulmonares podem ser ainda agrupadas de acordo com sua incidência e de acordo com o tempo após o TMO (VIDE QUADRO 2). Assim, infecções por bactérias e fungos, por exemplo, aparecem como agentes etiológicos mais comuns nas primeiras semanas após o transplante. (CRAWFORD, 1990). Ainda na fase de pós-transplante mais precoce, infecções por *Aspergillus* e outros fungos podem acometer em torno de 15% dos pacientes submetidos a TMO alogênico. Já as viroses causadas pelo CMV são mais frequentemente encontradas após o segundo mês do TMO, enquanto o vírus varicela-zoster (VZV) aparece após o quarto mês. Reativação viral pode ocorrer em cerca de 50-80% dos pacientes soropositivos para citomegalovírus (CMV) que realizarem TMO alogênico (MICHELSON et al., 2007). As fases mais tardias caracterizam-se por complicações como as infecções sino-pulmonares e a doença obstrutiva de vias aéreas, habitualmente relacionada com a DECH crônica. (CRAWFORD, 1990). Outros agentes infecciosos podem também se manifestar na fase tardia pós-transplante (cerca de dois meses depois do TMO). Agentes virais como adenovírus (ADV), herpes vírus humano 6 (HHV-6) e o metapneumovírus humano (hMPV) podem causar pneumonia durante essa fase. O desenvolvimento de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* é uma complicação séria e frequentemente fatal durante a fase tardia pós-transplante (MICHELSON et al., 2007).

QUADRO 1 – COMPLICAÇÕES PULMONARES EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

<u>COMPLICAÇÕES PRECOSES (<100 DIAS)</u>	INCIDÊNCIA (%)
EDEMA PULMONAR	0-50
PNEUMONIA INFECCIOSA	30-40
- BACTERIANA	2-30
- FÚNGICA	10-20
- VIRAL	20-30
- PROTOZOÁRIOS	<5
PENUMOPATIA IDIOPÁTICA	10-20
MUCOSITE ORAL	50-70
DOENÇA PULMONAR VENO-OCCLUSIVA	RARA
<u>COMPLICAÇÕES TARDIAS (> 100 DIAS)</u>	
BRONCOPNEUMONIA	20-30
PNEUMONIA IDIOPÁTICA	10-20
PNEUMONIA VIRAL	0-10
BRONQUIOLITE OBLITERANTE	10-20
ANORMALIDADES VASCULARES PULMONARES	50

CRAWFORD, S. 1990.

QUADRO 2 – TEMPO APROXIMADO DE INÍCIO DAS MAIORES COMPLICAÇÕES APÓS TMO



KROWKA, ROSENOW, HOAGLAND, 1985. Pneumocistis Carinii: Pneumocistis Jiroveci.

A pneumonite intersticial é a maior causa de morbidade e mortalidade após o transplante medula óssea. Os casos são divididos em infecciosos e não infecciosos, sendo o vírus o agente etiológico mais comum no primeiro grupo. Clinicamente, os sintomas são semelhantes independentemente da causa, evoluindo com dispneia, febre e tosse não produtiva. A causa mais importante infecciosa da pneumonite intersticial é pelo vírus citomegalovírus e está associado a uma taxa de mortalidade potencialmente alta. A infecção ocorre mais frequentemente quando o vírus latente é reativado como consequência da imunossupressão. O vírus sincicial respiratório, adenovírus, e herpesvírus humano foram detectados em pacientes que tiveram pneumonite intersticial difusa. O *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente conhecido como *Pneumocystis carinii*), que recentemente foi reclassificado como fungo, é outra causa potencial de pneumonite intersticial; no entanto, por causa do padrão de regimes de profilaxia antimicrobiana usados em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, é visto com menos frequência.

A pneumonite intersticial de causa não infecciosa ocorre por lesão difusa alveolar sem evidência de causas infecciosas em lavado broncoalveolar, biópsia e autópsia. Tipicamente ocorre como complicação precoce após o transplante e menos frequente como complicação tardia. Pensa-se que é resultado de uma variedade de insultos pulmonares que incluem doses secundárias para quimioterapia e radioterapia, sendo injúrias imunomediadas e relacionadas com as citocinas e infecção oculta (LEVINE et. al., 2007).

3.4 AS MOLÉCULAS E CÉLULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Todas essas afecções pulmonares envolvem respostas inflamatórias, que são mediadas por citocinas, interleucinas e algumas metaloproteinases como ADAM28 e ADAM33. Entender a expressão e o funcionamento dessas citocinas é importante para um melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças, favorecendo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais adequadas. Nesse estudo, serão analisadas a expressão das interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-

17, da metaloproteinase ADAM28 e ADAM33, bem como a expressão do co-receptores como CD8, CD4, CD3 e CD20.

A inflamação pulmonar aguda e crônica é desencadeada e controlada por vários mediadores endógenos que podem sofrer conversão pelas proteínas da família ADAM (DREYMUELLER et al., 2014). Essas metaloproteinases são expressas em vários tecidos adultos normais, como fibroblastos alveolares e em células do músculo liso dos brônquios. Além disso, ADAMs são expressas em maior quantidade em tecidos inflamados, o que sugere uma relação dessas proteínas com respostas inflamatórias (BAURAKIADES et al., 2014).

A metaloproteinase ADAM28 é expressa especificamente em linfócitos, o que sugere uma função imunológica. Essa proteína também é encontrada em uma forma secretada, mas algumas de suas funções permanecem desconhecidas (BAURAKIADES et al., 2014).

ADAM33 tem sido ligada a inflamação alérgica das vias aéreas, mas seu papel na fisiopatologia da asma permanece desconhecido. ADAM33 em sua forma solúvel promove angiogênese in vitro (DREYMUELLER et al., 2014) e possui papéis na remodelação de vias aéreas e em processos de reparo. Além disso, a ADAM33 foi identificada como um gene de suscetibilidade para doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose e para problemas pulmonares durante os primeiros anos de vida. Estudos subsequentes identificaram 24 polimorfismos para diferentes exons e íntrons do gene da proteína ADAM33, seis, dos quais, estão associados à asma (DREYMUELLER et al., 2014).

A IL-6 é uma citocina inflamatória sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células, como algumas células T ativadas, em resposta a microrganismos e a outras citocinas, especialmente IL-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Possui importantes funções como: (a) estimular a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos; (b) estimular produção de neutrófilos por progenitores da medula óssea, geralmente atuando de comum acordo com fatores estimuladores de colônias; (c) estimular o crescimento de plasmócitos; (d) atuar de forma similar a um fator de crescimento para plasmócitos. (ABBAS et al., 2007). Hoje se sabe que a IL6 se encontra superexpressada nas células da AF por meio de um mecanismo NF- κ B/TNF- α dependente. É provável que o mecanismo ocorra da seguinte forma: inicialmente a mutação da AF leva à superprodução de TNF- α , que serve de gatilho para a ativação de NF- κ B,

resultando em superexpressão de IL6, sendo que essa superexpressão participa e contribui para o aumento da migração, invasão e proliferação celular, facilitando a tendência de malignização das células dos pacientes com AF (EPANCHINTSEV et al., 2015).

A IL10, secretada por linfócitos Th2 e macrófagos, exerce uma importante função anti-inflamatória ao modular negativamente a síntese de outras citocinas, principalmente no macrófago (XUAN et al., 2016). Além de inibir a ação de células NK e de linfócitos Th1, e estimular a proliferação e função de mastócitos. Especificamente no pulmão, seus níveis aumentam após um pico inicial de interleucinas pró-inflamatórias, para conter o dano causado por esses e outros mediadores. Em ratos knockout deficientes de IL-10, o dano pulmonar por agressores externos é muito maior que em ratos controles (HIGAKI et al., 2015).

Vários autores relatam que a IL17 tem um papel na proteção de organismos contra bactéria extracelulares e fungos devido a capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas de infecção (NORMANTON, MARTI, 2013). Em geral, a maioria dos artigos, com a exceção do publicado por YI et al., mostraram que células Th17 ou IL17 participam no desencadeamento ou agravamento da DECH. (NORMANTON, MARTI, 2013).

As células TCD8⁺ tem como função destruir células infectadas e células tumorais que expressam antígenos associados ao MHC I. Dessa forma, compõem uma linhagem de células citotóxicas importantes para a imunidade do indivíduo (ABBAS et al., 2007). Nos pacientes da AF, a contagem total das células TCD8⁺ encontra-se diminuída quando comparada à controles hígidos; o que provavelmente compromete a vigilância imunológica e a atividade citotóxica nos pacientes da AF. Essa contagem reduzida de células TCD8⁺ também pode ser a causa para a vulnerabilidade a infecções observadas na AF (JUSTO et al., 2014). As células TCD8⁺ também são responsáveis por promover inflamação através da indução da expressão de moléculas de adesão endotelial e quimiocinas, que atuam no recrutamento de granulócitos e monócitos para invasão de tecidos. (MENG et al., 2011).

Os linfócitos TCD4⁺ desempenham as seguintes funções auxiliares: (a) auxiliam as células B a diferenciarem-se em células plasmáticas produtoras de anticorpos; (b) auxiliam as células TCD8⁺ a tornarem-se células T citotóxicas

ativadas e; (c) auxiliam os macrófagos no desenvolvimento da hipersensibilidade tardia (LEVINSON; JAWETZ, 1998).

As informações sobre o estado imunológico em pacientes com AF são escassas. Crianças com AF têm geralmente maior suscetibilidade às infecções. MYERS et al. demonstraram que pacientes com AF têm redução absoluta nos números de células NK e B e função citotóxica prejudicada.

Os níveis plasmáticos de citocinas também têm sido investigados em pacientes com AF. O TNF- α foi completamente estudado e, dados mostram que as linhagens celulares de pacientes com AF produzem quantidades elevadas desta citocina, sendo que o TNF- α estaria aumentado tanto no plasma como na medula óssea destes pacientes, contribuindo para a aplasia da mesma.

O perfil imunológico dos pacientes com AF com insuficiência da medula óssea avançada é caracterizado por linfopenia absoluta com redução das células B e NK, por um aumento relativo de células T, por uma redução de IgM e IgG e um aumento dos níveis séricos de IgA, e por um aumento no soro IL6 e TGF β e diminuição de CD4+.

O aumento dos níveis de IL6 está de acordo com o estado pró-inflamatório conhecido de AF que também é expresso pelo aumento da produção de IgA.

Em um estudo imunológico, não foram observadas diferenças nos níveis séricos de IL1 β , IL2, IL4, IL10, IL13, IL17 e IL23 entre os portadores de AF e o grupo controle. Este estudo mostra que os pacientes com AF com insuficiência avançada da medula óssea têm um estado imune alterado. Isto está de acordo com algumas características da AF, como o estado pró-inflamatório e pró-apoptótico. (KORTHOF et. al., 2013).

Em vista do acima exposto, a hipótese deste estudo é que o padrão de expressão tecidual das moléculas envolvidas na resposta inflamatória pacientes com complicações pulmonares pós-TMO é diferente da resposta inflamatória vista em pacientes não imunossuprimidos. Para melhor investigarmos esta resposta inflamatória, o objetivo deste trabalho é avaliar a expressão tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e a contagem de subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares de pacientes com anemia de Fanconi que foram a óbito por pneumopatia grave.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 24 casos de necropsias pediátricas cuja causa da morte foram complicações respiratórias graves em pacientes imunodeprimidos com anemia de Fanconi que tinham sido submetidos a transplante alogênico de células de medula óssea ou de cordão umbilical. Os pacientes tiveram a confirmação do diagnóstico de Anemia de Fanconi por meio de testes de instabilidade cromossômica. Dois agentes clastogênicos foram utilizados pelo serviço de citogenética do Hospital de Clínicas-Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) de acordo com a época do transplante: cisplatina nos anos de 1994 e 1995, e o diepoxibutano (DEB) entre os anos de 1996 a 2011.

Foram utilizadas amostras pulmonares pertencentes às necropsias de pacientes pediátricos provenientes da Unidade de TMO do Hospital de Clínicas (TMO-HC), cuja causa da morte foram complicações respiratórias graves pós-TMO em pacientes com anemia de Fanconi (n=24). A faixa etária dos pacientes variou entre 5 a 17 anos de idade, incluído ambos os gêneros, sendo 13 femininos e 11 masculinos. A média e a mediana de idade dos pacientes na realização do transplante foram, respectivamente, 10,4 e 10,5 anos.

4.2 VARIÁVEIS ANALISADAS NO ESTUDO

Os prontuários foram analisados e as seguintes variáveis foram consideradas:

a) Dados demográficos:

- 1- sexo do paciente,
- 2- etnia e,
- 3- idade no momento do TMO,

b) Dados pré-TMO

- 4- tempo da doença entre o diagnóstico de Fanconi e o TMO,

- 5- número de transfusões antes do TMO e,
- 6- score de Karnofsky-Lansky pré-TMO,
- c) Dados relativos ao TMO
 - 7- tipo de doador,
 - 8- histocompatibilidade do doador,
 - 9- origem das células,
 - 10- tipo de condicionamento pré-TMO.
 - 11- tipo de imunoprofilaxia,
 - 12- pega do enxerto,
 - 13- quimerismo,
 - 14- presença de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
 - 15- presença de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica,
 - 16- necessidade de re-TMO
- d) Dados relativos a presença de infecções
 - 17- presença de infecções bacterianas,
 - 18- presença de infecções virais e,
 - 19- presença de infecções fúngicas,
- e) Dados anatomopatológicos de necropsia e sobrevida
 - 20- causa da morte,
 - 21- diagnóstico anatomopatológico no pulmão e,
 - 22- sobrevida.

Todas estas variáveis foram correlacionadas com os dados de expressão dos biomarcadores estudados.

4.3 BLOCOS MULTIAMOSTRAIS

As amostras pulmonares dos casos do estudo foram separadas, sendo que blocos parafinados contendo tecido pulmonar em bom estado de conservação foram utilizados na confecção de blocos multiamostrais (TMA = tissue microarray).

Para a construção dos blocos multiamostrais (ou blocos em tissue microarray = TMA), sendo que 4 áreas foram puncionadas e retiradas dos blocos originais (blocos-doadores) e organizadas em blocos de parafina multiamostrais

(blocos receptores). Foram construídos TMAs com 6 casos cada um, sendo 4 amostras de cada caso.

4.4 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Para identificar as moléculas de adesão Adam 28 e 33, as interleucinas 6, 8, 10, 17 e os subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 nas amostras pulmonares parafinadas dispostas em TMA foram utilizados os anticorpos contra as proteínas citadas. Todos os TMAs foram marcados juntamente com lâminas de controle positivo e controle negativo. O protocolo de imunohistoquímica utilizou incubação dos anticorpos primários overnight, em câmara úmida e temperatura entre 2 e 8° C. O polímero secundário (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA) foi incubado com o material por 25 minutos. Para a revelação, foi adicionado complexo 2, 3, dimino-benzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por 3 minutos.

4.5 ANÁLISES DOS MARCADORES

4.5.1 Análise das interleucinas 6, 10, 17 e 8 e das moléculas de adesão ADAM 33 e 28:

As lâminas de TMA imunocoradas foram fotografadas utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1. Para cada amostra, são obtidas aproximadamente 600 imagens em objetiva de 20x e dessas, aproximadamente 500 são excluídas, gerando para análise em torno de 100 imagens satisfatórias. Para o controle positivo foi escolhido como “máscara”, a imagem que continha níveis adequados de imunexpressão tecidual de cada uma das proteínas estudadas acima citadas. A máscara em seguida, foi sobreposta às imagens das amostras. E, com base no ideal positivo de imunexpressão tecidual obtido da “máscara”, programa de análise morfométrica Image Pro Plus® 4 identificou as áreas imunopositivas nas amostras teciduais e transformou esses resultados em áreas de imunexpressão positivas por micrômetro quadrado (μm^2). A área imunopositiva em μm^2 , obtida com esse método, foi dividida pela área total do campo observado, gerando assim, um valor percentual para um campo de médio aumento (MALAQUIAS *et al.*, 2017, Baurakiades *et al.*, 2014).

4.5.2 Análise dos linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD3+ e BCD20+:

A expressão tecidual destes biomarcadores estudados acima citados foi medida através da contagem de linfócitos imunopositivos por campo de grande aumento (40x) em cerca de 20 a 50 campos, com posterior cálculo da média de linfócitos positivos por campo de grande aumento (BAURAKIADES et al., 2014)

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões ou por frequências e percentuais. Para a comparação de dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Em todas as análises o nível de significância adotado será de 5%.

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para variáveis categóricas foram apresentadas frequências e percentuais. O tempo de sobrevida foi descrito por curvas de Kaplan-Meier. Para a comparação de dois grupos, em relação ao tempo de sobrevida, foi usado o teste de Log-rank. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliação da associação entre duas variáveis quantitativas, foram estimados coeficientes de correlação de Spearman. Para os testes estatísticos os dados de tempo de sobrevida foram submetidos a uma transformação logarítmica. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 24 lâminas de pacientes que vieram a óbito no período compreendido entre junho de 1994 a abril de 2011 por complicações respiratórias após o TMO. Seis pacientes realizaram dois transplantes e o restante somente um, totalizando 30 transplantes.

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES DO ESTUDO.

DADOS	VARIÁVEL		N de pacientes	%	MED	MÍN	MÁX
Demográficos	Gênero	Fem	13	54,2			
		Masc	11	45,8			
	Idade		24		10,5	4	17
	Etnia	Negro	9	37,5			
Branco		15	62,5				
Pré-transplante	Número de Transfusões		23		19	0	125
	Duração da doença até o TMO (meses)		24		29	3	122
	Karnofsky/Lansky pré		23		90	50	100
Anatomopat	Hemorragia pulmonar		6	25			
	Pneumonia viral		8	33,3			
	DECH pulmonar		1	4,2			
	Pneumonia bacteriana		3	12,5			
	Pneumonia fúngica		6	25			
Sobrevida (dias)			24		235	59	2524

Legenda: Anatomopat = dados anatomopatológicos relativos ao pulmão; DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro; Fem = feminino; masc = masculino; MED = mediana; MIN = valores mínimos; MAX = valores máximos.

TABELA 2 – DADOS CLÍNICOS RELATIVOS AO TIPO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, CONDICIONAMENTO E PROFILAXIA REALIZADA NOS PACIENTES DO ESTUDO

DADOS CLÍNICOS RELATIVOS AO TRANSPLANTE	VARIÁVEL		N	%	VARIÁVEL		N	%
	Tipo de doador	Aparentado		12	50	Pega do enxerto	NP	8
	Não aparentado		12	50	PP		3	13,6
					PC		11	50
Compatibilidade HLA	Compatível		13	54,2	Pega do enxerto	Não	8	36,4
	Incompatível		11	45,8		Sim	14	63,6
Condicionamento	CFA		12	50	Quimerismo	Sim	10	83,3
	CFA+outro		12	50		Não	2	16,7
Origem da célula	MO		17	70,8	Grau de DECH a	Ausente	16	66,7
	SC		7	29,2		Leve	2	8,3
						Extenso	6	25
Condicionamento	CFA		12	50	Grau de DECH c	Ausente	20	83,3
	CFA+Fludara		2	8,3		Leve	1	4,2
	CFA+Fludara+ATG		8	33,3		Extenso	3	12,5
	CFA+Fludara+TBI		1	4,2				
	CFA+ATG+TBI		1	4,2				
Imunoprofilaxia	CSA		2	8,3	Segundo TMO	Não	18	75
	MTX+CSA		15	62,5		Sim	6	25
	CSA+CTC		5	20,8				
	CSA+CFA+MMF		1	4,2				
	CSA+DEPL.CÉL T		1	4,2				

Legenda: MO = medula óssea; SC = sangue do cordão; CFA: ciclofosfamida, Fludara: fludarabina; ATG: globulina anti timocítica; TBI: irradiação corporal total; CSA: ciclosporina; MTX: metotrexato; CTC: corticoide; MMF: micofenolato mofetil; DEPL. CÉL T: depleção células T; NP = não pegou, PP = pega parcial; PC = pega completa; DECH a = doença do enxerto contra o hospedeiro aguda; DECH c = doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.

TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS RELATIVOS ÀS COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES DO ESTUDO NO PÓS TRANSPLANTE

VARIÁVEL		N	%	
DADOS CLÍNICOS RELATIVOS À INFECCÕES	Bacteriana	Ausente	7	29,2
		Sim-sangue	14	58,3
		Sim-intestino	1	4,2
		Sim-pulmão	1	4,2
		Sim-colón	1	4,2
	Viral	Ausente	13	54,2
		CMV	6	25
		Grupo herpes	2	8,3
		EBV	2	8,3
		ADV	1	4,2
	Fúngica	Ausente	13	54,2
		<i>Aspergillus</i>	4	16,7
		Outros fungos não identificados	3	12,5
		<i>Candida</i>	3	12,5
		<i>Fusarium</i>	1	4,2

Legenda: CMV: citomegalovírus; EBV: Ebstein-Barr; ADV: adenovírus.

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os dados demográficos clínicos e epidemiológicos dos pacientes, relativos ao pré-transplante e ao pós-transplante.

Um elevado número de pacientes realizou transfusões antes do transplante (n=23). Não houve relação entre o número de transfusões com a idade dos pacientes (tabela 1).

O tempo de duração entre o diagnóstico da doença e a realização do transplante foi feita em meses. Foram 40,5 meses o tempo médio, com 29 meses de mediana (mínimo de 3, máximo de 122 meses) como demonstra a tabela 1.

Para descrever o estado geral do paciente, utilizou-se as escalas de desempenho de Karnofsky e de Lansky de acordo com a idade. Essas escalas pontuam o paciente entre 10 a 100 pontos. Se o paciente tem mais que 15 anos se usa a escala de Karnofsky, se o paciente tem menos que 15 anos a escala de

Lansky. Os pacientes tiveram a média de 86,5 pontos na escala, com mediana de 90 pontos, representando um bom estado geral (tabela 1).

A média e mediana de sobrevivência dos pacientes foram, respectivamente, 235 (\pm 528) e 59 (2524;2) meses (tabela 1).

Seis pacientes do estudo foram submetidos a um segundo transplante. Neste segundo transplante, quatro pacientes receberam as células da medula óssea de doadores não aparentados e dois aparentados (irmão e mãe) como demonstra a tabela 2.

Neste estudo, foram observados 13 doadores que tiveram histocompatibilidade HLA e o estudo citogenético foi realizado em 14 pacientes, após o ano de 1998 (tabela 2).

Após o transplante, os pacientes foram avaliados quanto a pega ou não das células do doador. A pega ocorre em torno de 2 a 4 semanas após a infusão, indicando que o transplante foi bem-sucedido e que a medula voltou a funcionar. Até 1995, a avaliação da pega era feita através da diferença entre o sexo do paciente e do doador ou por tipagem sanguínea. A análise do quimerismo pode ser feita através dos marcadores VNTR ou STR. No Hospital das Clínicas da UFPR, essa análise iniciou a partir de 1995 com o uso de marcadores VNTR. Dentre os pacientes do estudo, 12 fizeram a análise do quimerismo, sendo esta realizada somente através do VNTR. Esse é um método que utiliza gel de poliacrilamida para separação de fragmentos amplificados e sais de prata como coloração para visualização desses. O quimerismo completo é definido como a presença de mais de 95% de células do doador e o quimerismo misto com a presença de 95% ou menos de células do doador. A ausência de células do doador é definida quando o quimerismo é menor que 5% (tabela 2).

Após o transplante, os pacientes foram submetidos a imunoprofilaxia para a diminuição da rejeição e da DECH aguda e crônica (vide tabela 2).

A tabela 3 demonstra os dados relativos as complicações infecciosas apresentadas pelos pacientes no pós-TMO.

As complicações pulmonares são comuns e interferem no sucesso do TMO. Elas podem ser infecciosas e não infecciosas, precoces e tardias. São particularmente importantes pela sua prevalência e suas consequências habitualmente severas (KROWKA et. al, 1985).

Dos pacientes em que ocorreu DECH, os órgãos mais acometidos foram pele, fígado e intestino. Considerando a classificação clássica, os pacientes apresentaram DECH aguda pois vieram à óbito em menos de 100 dias após o transplante.

A evolução clínica de todos os pacientes foi para insuficiência respiratória e óbito.

Todas as variáveis acima mencionadas foram correlacionadas com os dados de interleucinas, moléculas de adesão e subtipos de linfócitos relatados na tabela 4.

TABELA 4 – DADOS DE EXPRESSÃO DÀS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS:

Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
IL6	20	10,55	8,72	0,589	24,27	7,30
IL10	23	0,99	0,30	0,018	5,03	1,41
IL8	12	4,09	1,93	0,535	24,02	6,45
IL17	12	20,19	17,14	6,505	42,88	10,42
Adam28	18	7,06	7,99	0,341	12,82	4,02
Adam33	16	12,43	13,83	0,160	29,61	7,75
CD3	21	0,14	0,06	0,000	0,83	0,20
CD20	21	1,19	1,08	0,200	2,31	0,59
CD4	22	1,91	1,48	0,400	6,22	1,42
CD8	24	8,65	8,16	0,070	30,76	8,23

Legenda: a expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

TABELA 5 – DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS POR PACIENTE DO ESTUDO ALÉM DE DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS PULMONARES:

Nº	% IL6	% IL10	% IL8	% IL17	% adam28	% adam33	CD3	CD20	CD4	CD8	PADRÃO ANATOMOPATOLÓGICO PULMONAR
1	11,16	3,27	24,02	42,88	12,82	15,48	0,03	2,00	1,18	1,0600	HEMORRAGIA
2	20,62	1,70			8,78		0,13	1,21	6,22	12,0600	INFECCIOSO VIRAL
3		3,21					0,00			0,2200	INFECCIOSO VIRAL
4		5,03						2,10		0,0700	HEMORRAGIA
5	3,49	0,36			10,81	14,51	0,02	2,31	1,88	7,8200	INFECCIOSO VIRAL
6		3,29							0,62	1,5300	HEMORRAGIA
7	2,78	0,20	6,13	23,05	8,90	9,65	0,06	0,77	0,76	1,7700	DECH
8	3,35	0,13	1,14	8,16	4,95	3,72	0,05	0,56	3,58	23,1500	INFECCIOSO BACTERIANO
9									3,14	10,8400	INFECCIOSO VIRAL
10	5,33	0,13	3,12	14,87	1,32	10,66	0,00	2,02	1,58	9,1500	INFECCIOSO VIRAL
11	18,51	1,23					0,15	1,38	2	8,5100	INFECCIOSO FÚNGICO
12	18,52	0,48			11,66	17,58	0,17	1,00	0,89	15,8100	INFECCIOSO VIRAL
13	7,90	0,06	3,47	21,41	11,37	13,94	0,00	0,20	0,4	3,4000	INFECCIOSO FÚNGICO
14	3,85	0,05	1,66	15,79	11,19	13,72	0,27	0,84	1,74	9,8500	INFECCIOSO FÚNGICO
15	24,27	1,97					0,50	1,20	2,56	5,2800	HEMORRAGIA
16	9,55	0,05	2,89	29,07	10,44	8,52	0,07	0,29	1,04	19,7200	HEMORRAGIA
17	0,59	0,02	0,54	6,51	0,34	0,16	0,83	0,87	3,15	17,9500	INFECCIOSO FÚNGICO
18	20,31	0,30			3,40	17,67	0,04	2,02	0,46	30,7600	INFECCIOSO BACTERIANO
19	15,29	0,06	1,06	32,41	8,09	29,61	0,14	1,08	0,45	14,2800	INFECCIOSO FÚNGICO
20	16,35	0,47			6,04		0,14	0,90	1,24	8,5800	INFECCIOSO VIRAL
21	7,02	0,16			5,12	21,03	0,00	1,03	1,37	2,4800	INFECCIOSO FÚNGICO
22	3,21	0,04	1,55	13,83	1,93	2,33	0,00	0,89	1,28	0,3500	HEMORRAGIA
23	5,28	0,23	1,37	18,36	7,89	17,1	0,05	1,23	3,88	1,1600	INFECCIOSO VIRAL
24	13,58	0,37	2,19	15,92	2,10	3,25	0,23	1,16	2,68	1,9200	INFECCIOSO BACTERIANO

Legenda: O padrão anatomopatológico pulmonar se refere aos achados anatomopatológicos nas amostras pulmonares das necropsias estudadas. Foram detectados 3 padrões, sendo o infeccioso (de etiologia possivelmente viral, fúngica ou bacteriana), hemorrágico e o de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

TABELA 6 – DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS EM RELAÇÃO AOS DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES

PADRÃO ANATOMOPATOLÓGICO	n	%	IL6	IL10	IL8	IL 17	ADAM 28	ADAM 33	CD3	CD20	CD 4	CD8
HEMORRAGIA	6	25,0	12,05±8,84	2,27±1,98	9,48±12,6	28,59±14,53	8,39±5,73	8,78±6,57	0,15±0,24	1,29±0,76	1,33±0,72	4,67± 8,17
INFECCIOSO VIRAL	8	33,3	11,6±7,70	0,94±1,12	2,24±1,23	16,61±2,46	7,75±3,74	14,97±3,17	0,07±0,06	1,44±0,57	2,69±1,88	8,2±5,26
GHVD	1	4,2										
INFECCIOSO BACTERIANO	3	12,5	12,41±8,54	0,27±0,12	1,67±0,74	12,04±5,48	3,49±1,42	8,22±8,19	0,11±0,1	1,24±0,73	2,24±1,6	18,61±14,94
INFECCIOSO FÚNGICO	6	25,0	8,86±6,14	0,26±0,47	1,68±1,27	19,03±10,83	7,22±4,62	15,7±10,84	0,23±0,31	0,9±0,39	1,52±1,03	9,41±6,03
Total	24	100,0										

Legenda: O padrão anatomopatológico pulmonar se refere aos achados anatomopatológicos nas amostras pulmonares das necropsias estudadas. Foram detectados 3 padrões, sendo o infeccioso (de etiologia possivelmente viral, fúngica ou bacteriana), hemorrágico e o de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

No estudo, os linfócitos CD8 apresentaram-se mais elevados nas amostras dos pacientes onde foram encontrados padrão anatomopatológico infeccioso, seja por vírus, bactéria ou fungo com $p = 0,03$ (tabelas 5 e 6).

As interleucinas 8 e 10 apresentaram-se aumentadas nos pacientes que fizeram o condicionamento entre os anos de 1993 a 1998, com $p = 0,03$ e $0,02$ respectivamente. A interleucina 17 também apresentou valores baixos nesses pacientes com $p = 0,08$ (tabela 7).

Não houve diferenças significativas quando analisamos as expressões de interleucinas, moléculas de adesão e subtipos de linfócitos em relação ao tipo de profilaxia pós-TMO e suas variantes como combinações de drogas e doses (tabela 8).

A tabela 9 demonstras as complicações pulmonares sob o ponto de vista clínico, dos pacientes deste estudo.

TABELA 7 – DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS EM DIFERENTES CONDICIONAMENTOS PRÉ TMO

Nº	Ano TMO	Tipo doador	% IL6	% IL10	% IL8	% IL17	% adam28	% adam33	CD3	CD20	CD4	CD8	condicionamento
1	1994	aparentado	11,16	3,27	24,02	42,88	12,82	15,48	0,03	2,00	1,18	1,0600	CFA
2	1993	aparentado	20,62	1,70			8,78		0,13	1,21	6,22	12,0600	CFA
3	1996	não aparentado		3,21					0,00			0,2200	CFA
4	1996	aparentado		5,03						2,10		0,0700	CFA
5	1997	não aparentado	3,49	0,36			10,81	14,51	0,02	2,31	1,88	7,8200	CFA+ATG+TBI
6	1998	aparentado		3,29							0,62	1,5300	CFA
7	1998	aparentado	2,78	0,20	6,13	23,05	8,90	9,65	0,06	0,77	0,76	1,7700	CFA
8	1999	aparentado	3,35	0,13	1,14	8,16	4,95	3,72	0,05	0,56	3,58	23,1500	CFA
9	2001	não aparentado									3,14	10,8400	CFA
10	2002	não aparentado	5,33	0,13	3,12	14,87	1,32	10,66	0,00	2,02	1,58	9,1500	CFA+Fludara
11	2002	não aparentado	18,51	1,23					0,15	1,38	2	8,5100	CFA+Fludara
12	2003	não aparentado	18,52	0,48			11,66	17,58	0,17	1,00	0,89	15,8100	CFA+Fludara+ATG
13	2003	aparentado	7,90	0,06	3,47	21,41	11,37	13,94	0,00	0,20	0,4	3,4000	CFA+Fludara+ATG
14	2004	não aparentado	3,85	0,05	1,66	15,79	11,19	13,72	0,27	0,84	1,74	9,8500	CFA+Fludara+ATG
15	2000	aparentado	24,27	1,97					0,50	1,20	2,56	5,2800	CFA
16	2005	não aparentado	9,55	0,05	2,89	29,07	10,44	8,52	0,07	0,29	1,04	19,7200	CFA+Fludara+ATG
17	2005	não aparentado	0,59	0,02	0,54	6,51	0,34	0,16	0,83	0,87	3,15	17,9500	CFA+Fludara+ATG
18	2003	aparentado	20,31	0,30			3,40	17,67	0,04	2,02	0,46	30,7600	CFA
19	2005	não aparentado	15,29	0,06	1,06	32,41	8,09	29,61	0,14	1,08	0,45	14,2800	CFA+Fludara+ATG
20	2008	aparentado	16,35	0,47			6,04		0,14	0,90	1,24	8,5800	CFA+Fludara+TBI
21	2007	não aparentado	7,02	0,16			5,12	21,03	0,00	1,03	1,37	2,4800	CFA+Fludara+ATG
22	2008	aparentado	3,21	0,04	1,55	13,83	1,93	2,33	0,00	0,89	1,28	0,3500	CFA
23	2010	aparentado	5,28	0,04	1,37	18,36	7,89	17,1	0,05	1,23	3,88	1,1600	CFA
24	2011	não aparentado	13,58	0,04	2,19	15,92	2,10	3,25	0,23	1,16	2,68	1,9200	CFA+Fludara+ATG

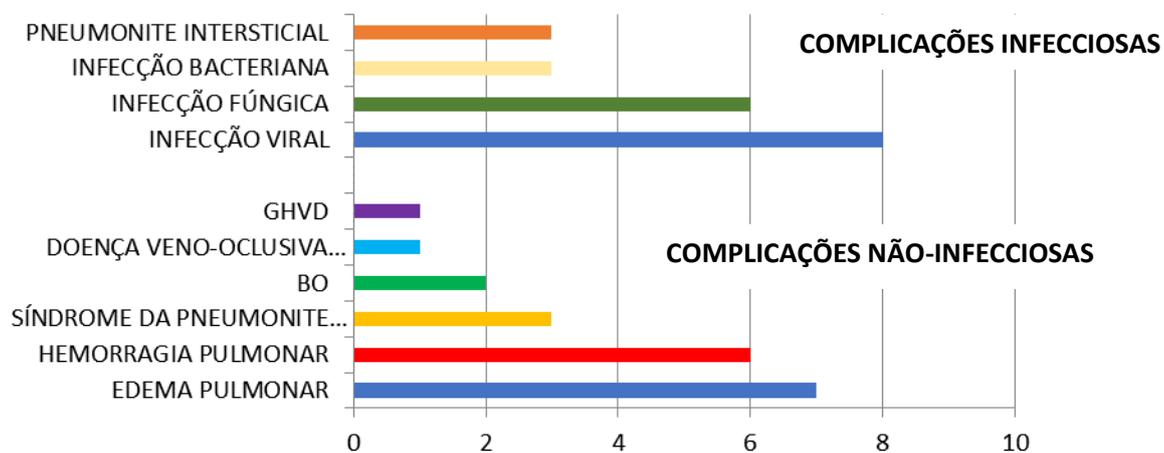
Legenda: CFA: ciclofosfamida, Fludara: fludarabina; ATG: globulina anti timocítica; TBI: irradiação corporal total. No condicionamento pré-transplante, nos pacientes que receberam transplantes de doadores aparentados, a partir de 1993 a dose da CFA era de 200 mg kg, sendo essa dose reduzida progressivamente até chegar ao limite de 60 mg kg em 1999. Nos pacientes que receberam transplante de doadores não aparentados, inicialmente também foram tratados com CFA isolada. A partir do ano de 2000, a FLU foi acrescentada à CFA e, desde o ano de 2002, a associação de CFA, FLU e ATG tornou-se o regime padrão utilizado nos transplantes desses pacientes (BONFIM, 2014). A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

TABELA 8 – DADOS DE EXPRESSÃO DAS INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS DE ACORDO COM A IMUNOPROFILAXIA PÓS-TMO

Nº	Ano TMO	% IL6	% IL10	% IL8	% IL17	% adam28	% adam33	CD3	CD20	CD4	CD8	imunoprofilaxia
1	1994	11,16	3,27	24,02	42,88	12,82	15,48	0,03	2,00	1,18	1,0600	csa
2	1993	20,62	1,70			8,78		0,13	1,21	6,22	12,0600	csa
3	1996		3,21					0,00			0,2200	mtx+csa
4	1996		5,03						2,10		0,0700	mtx+csa
5	1997	3,49	0,36			10,81	14,51	0,02	2,31	1,88	7,8200	csa+depl.cél T
6	1998		3,29							0,62	1,5300	mtx+csa
7	1998	2,78	0,20	6,13	23,05	8,90	9,65	0,06	0,77	0,76	1,7700	mtx+csa
8	1999	3,35	0,13	1,14	8,16	4,95	3,72	0,05	0,56	3,58	23,1500	mtx+csa
9	2001									3,14	10,8400	mtx+csa
10	2002	5,33	0,13	3,12	14,87	1,32	10,66	0,00	2,02	1,58	9,1500	csa+ctc
11	2002	18,51	1,23					0,15	1,38	2	8,5100	csa+ctc
12	2003	18,52	0,48			11,66	17,58	0,17	1,00	0,89	15,8100	mtx+csa
13	2003	7,90	0,06	3,47	21,41	11,37	13,94	0,00	0,20	0,4	3,4000	mtx+csa
14	2004	3,85	0,05	1,66	15,79	11,19	13,72	0,27	0,84	1,74	9,8500	csa+ctc
15	2000	24,27	1,97					0,50	1,20	2,56	5,2800	mtx+csa
16	2005	9,55	0,05	2,89	29,07	10,44	8,52	0,07	0,29	1,04	19,7200	csa+ctc
17	2005	0,59	0,02	0,54	6,51	0,34	0,16	0,83	0,87	3,15	17,9500	csa+ctc
18	2003	20,31	0,30			3,40	17,67	0,04	2,02	0,46	30,7600	mtx+csa
19	2005	15,29	0,06	1,06	32,41	8,09	29,61	0,14	1,08	0,45	14,2800	mtx+csa
20	2008	16,35	0,47			6,04		0,14	0,90	1,24	8,5800	csa+CFA+MMF
21	2007	7,02	0,16			5,12	21,03	0,00	1,03	1,37	2,4800	mtx+csa
22	2008	3,21	0,04	1,55	13,83	1,93	2,33	0,00	0,89	1,28	0,3500	mtx+csa
23	2010	5,28	0,04	1,37	18,36	7,89	17,1	0,05	1,23	3,88	1,1600	mtx+csa
24	2011	13,58	0,04	2,19	15,92	2,10	3,25	0,23	1,16	2,68	1,9200	mtx+csa

Legenda: CFA: ciclofosfamida, Fludara: fludarabina; ATG: globulina anti timocítica; TBI: irradiação corporal total; CSA: ciclosporina; MTX: metotrexato; CTC: corticoide; MMF: micofenolato mofetil; DEPL. CÉL T: depleção células T. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

TABELA 9 – COMPLICAÇÕES PULMONARES INFECCIOSAS E NÃO-INFECCIOSAS NAS AMOSTRAS PULMONARES DOS PACIENTES DO ESTUDO SOB O PONTO DE VISTA CLÍNICO:



Legenda: GHVD = DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro; BO: Bronquiolite Obliterante.

Passaremos a apresentar apenas as variáveis com resultados estatisticamente significativos.

As variáveis que não apresentaram resultados significativos foram idade, etnia, segunda tentativa de TMO, tipo de doador, imunoprofilaxia, pega, número de transfusões antes do transplante, quimerismo, DECH aguda e crônica e infecção viral. Para quimerismo não foram aplicados testes estatísticos, pois o número de casos sem quimerismo é pequeno.

TABELA 10 – CORRELACIONA A INCOMPATIBILIDADE HLA DOS PACIENTES SUBMENTIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCIAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS:

Marcador	Compatibilidade HLA	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% IL6	Compatível	11	11,51	11,16	2,78	24,27	8,32	
	Não compatível	9	9,38	7,90	0,59	18,51	6,11	0,766
% IL10	Compatível	13	1,34	0,37	0,04	5,03	1,61	
	Não compatível	10	0,54	0,09	0,02	3,21	1,01	0,049
% IL8	Compatível	6	6,07	1,87	1,14	24,02	8,99	
	Não compatível	6	2,12	2,27	0,54	3,47	1,20	0,699
% IL17	Compatível	6	20,37	17,14	8,16	42,88	12,08	
	Não compatível	6	20,01	18,60	6,51	32,41	9,64	1
% adam28	Compatível	10	7,32	8,34	1,93	12,82	3,99	
	Não compatível	8	6,74	7,07	0,34	11,37	4,31	0,762
% adam33	Compatível	9	11,25	14,51	2,33	17,67	6,58	
	Não compatível	7	13,95	13,72	0,16	29,61	9,36	0,918
CD3	Compatível	11	0,12	0,05	0,00	0,50	0,14	
	Não compatível	10	0,16	0,10	0,00	0,83	0,25	0,973
CD20	Compatível	12	1,37	1,20	0,56	2,31	0,58	
	Não compatível	9	0,96	0,90	0,20	2,02	0,54	0,129
CD4	Compatível	12	2,17	1,58	0,46	6,22	1,72	
	Não compatível	10	1,61	1,48	0,40	3,15	0,96	0,628
CD8	Compatível	13	7,90	1,92	0,07	30,76	9,86	
	Não compatível	11	9,54	9,15	0,22	19,72	6,12	0,252

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

A variável da compatibilidade HLA (tabela 10), quando correlacionada com a interleucina IL10, apresentou maior concentração desta interleucina no grupo compatível com um valor de p igual a 0,049.

TABELA 11 – CORRELACIONA O TIPO DE CONDICIONAMENTO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS:

Marcador	Condicionamento	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% IL6	Somente CFA	8	11,37	8,22	2,78	24,27	9,05	
	CFA + outro	12	10,00	8,72	0,59	18,52	6,25	0,970
% IL10	Somente CFA	11	1,76	1,70	0,04	5,03	1,73	
	CFA + outro	12	0,29	0,15	0,02	1,23	0,34	0,044
% IL8	Somente CFA	5	6,84	1,55	1,14	24,02	9,82	
	CFA + outro	7	2,13	2,19	0,54	3,47	1,10	0,755
% IL17	Somente CFA	5	21,26	18,36	8,16	42,88	13,28	
	CFA + outro	7	19,42	15,92	6,51	32,41	8,93	1
% adam28	Somente CFA	7	6,95	7,89	1,93	12,82	3,75	
	CFA + outro	11	7,13	8,09	0,34	11,66	4,37	0,860
% adam33	Somente CFA	6	10,99	12,57	2,33	17,67	6,81	
	CFA + outro	10	13,30	13,83	0,16	29,61	8,50	0,875
CD3	Somente CFA	9	0,10	0,05	0,00	0,50	0,16	
	CFA + outro	12	0,17	0,14	0,00	0,83	0,23	0,310
CD20	Somente CFA	9	1,33	1,21	0,56	2,10	0,58	
	CFA + outro	12	1,09	1,01	0,20	2,31	0,61	0,382
CD4	Somente CFA	10	2,37	1,92	0,46	6,22	1,86	
	CFA + outro	12	1,54	1,48	0,40	3,15	0,83	0,456
CD8	Somente CFA	12	7,35	1,65	0,07	30,76	10,14	
	CFA + outro	12	9,96	8,87	1,92	19,72	5,92	0,101

Legenda: CFA: ciclofasfamida. *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

Na variável do condicionamento (tabela 11), correlacionando com a interleucina IL10, os pacientes que receberam somente CFA apresentaram um valor mais alto desta interleucina, com um p de 0,044.

TABELA 12 – CORRELACIONA A ORIGEM DAS CÉLULAS DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS:

Marcador	Origem das células	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% IL6	MO	14	11,87	12,37	2,78	24,27	7,55	0,353
	SC	6	7,48	6,18	0,59	18,51	6,19	
% IL10	MO	17	1,25	0,37	0,04	5,03	1,55	0,036
	SC	6	0,27	0,09	0,02	1,23	0,47	
% IL8	MO	8	5,12	1,87	1,06	24,02	7,82	0,808
	SC	4	2,05	2,27	0,54	3,12	1,19	
% IL17	MO	8	22,00	19,88	8,16	42,88	11,05	0,368
	SC	4	16,56	15,33	6,51	29,07	9,33	
% adam28	MO	13	7,60	8,09	1,93	12,82	3,66	0,387
	SC	5	5,68	5,12	0,34	11,19	5,02	
% adam33	MO	11	13,17	14,51	2,33	29,61	8,07	0,510
	SC	5	10,82	10,66	0,16	21,03	7,61	
CD3	MO	15	0,10	0,05	0,00	0,50	0,13	0,569
	SC	6	0,22	0,11	0,00	0,83	0,32	
CD20	MO	15	1,24	1,16	0,20	2,31	0,61	0,519
	SC	6	1,07	0,95	0,29	2,02	0,58	
CD4	MO	15	1,87	1,24	0,40	6,22	1,65	0,332
	SC	7	2,00	1,74	1,04	3,15	0,84	
CD8	MO	17	7,60	3,40	0,07	30,76	8,96	0,114
	SC	7	11,21	9,85	2,48	19,72	5,88	

Legenda: SC = sangue do cordão; MO = medula óssea. *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

Quanto a origem das células para o TMO (tabela 12), correlacionando com a interleucina IL10, os pacientes que receberam células da MO apresentaram um valor maior desta interleucina, com um p de 0,036.

TABELA 13 – CORRELACIONA A PRESENÇA DE INFECÇÃO BACTERIANA NOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS:

Marcador	Infecção Bacteriana	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% IL6	Não	6	12,61	13,23	3,35	20,31	6,64	0,397
	Sim	14	9,67	6,62	0,59	24,27	7,63	
% IL10	Não	7	1,10	0,30	0,06	3,29	1,50	0,579
	Sim	16	0,95	0,30	0,02	5,03	1,42	
% IL8	Não	3	8,74	1,14	1,06	24,02	13,23	0,727
	Sim	9	2,55	2,19	0,54	6,13	1,64	
% IL17	Não	3	27,82	32,41	8,16	42,88	17,81	0,373
	Sim	9	17,65	15,92	6,51	29,07	6,39	
% adam28	Não	6	7,67	6,61	3,40	12,82	3,87	0,616
	Sim	12	6,76	8,34	0,34	11,37	4,23	
% adam33	Não	6	17,52	17,63	3,72	29,61	8,40	0,016
	Sim	10	9,38	10,16	0,16	17,10	5,78	
CD3	Não	6	0,07	0,04	0,00	0,17	0,07	0,622
	Sim	15	0,16	0,07	0,00	0,83	0,23	
CD20	Não	6	1,28	1,05	0,56	2,02	0,60	0,850
	Sim	15	1,16	1,16	0,20	2,31	0,61	
CD4	Não	7	1,22	0,89	0,45	3,58	1,10	0,066
	Sim	15	2,24	1,88	0,40	6,22	1,47	
CD8	Não	7	12,72	14,28	1,06	30,76	11,63	0,288
	Sim	17	6,98	7,82	0,07	19,72	6,03	

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

Quanto aos pacientes que não tiveram infecções bacterianas (tabela 13), ao serem correlacionados com os valores de ADAM 33, observou-se que aqueles pacientes sem infecção bacteriana tiveram valores mais baixo de ADAM33, com um valor de p de 0,016.

TABELA 14 – CORRELACIONA A PRESENÇA DE INFECÇÃO FÚNGICA NOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO COM AS EXPRESSÕES DE INTERLEUCINAS, MOLÉCULAS DE ADESÃO E SUBTIPOS DE LINFÓCITOS ESTUDADOS:

Marcador	Infecção fúngica	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% IL6	Não	10	9,80	8,72	2,78	24,27	6,83	0,739
	Sim	10	11,30	11,16	0,59	20,62	8,04	
% IL10	Não	12	1,24	0,28	0,04	5,03	1,72	0,928
	Sim	11	0,72	0,30	0,02	3,21	0,98	
% IL8	Não	8	5,63	3,00	1,55	24,02	7,57	0,004
	Sim	4	1,03	1,10	0,54	1,37	0,35	
% IL17	Não	8	22,10	18,66	13,83	42,88	9,86	0,461
	Sim	4	16,36	13,26	6,51	32,41	11,91	
% adam28	Não	9	7,35	8,90	1,32	12,82	4,58	0,666
	Sim	9	6,78	7,89	0,34	11,66	3,64	
% adam33	Não	8	9,69	10,16	2,33	15,48	4,87	0,083
	Sim	8	15,17	17,34	0,16	29,61	9,38	
CD3	Não	10	0,13	0,06	0,00	0,50	0,16	0,973
	Sim	11	0,14	0,05	0,00	0,83	0,24	
CD20	Não	11	1,12	0,90	0,20	2,10	0,66	0,349
	Sim	10	1,27	1,14	0,56	2,31	0,53	
CD4	Não	12	1,52	1,26	0,40	3,14	0,86	0,254
	Sim	10	2,39	1,94	0,45	6,22	1,83	
CD8	Não	13	5,66	3,40	0,07	19,72	5,74	0,106
	Sim	11	12,20	12,06	0,22	30,76	9,53	

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. A expressão das interleucinas e moléculas de adesão está em porcentagem por campo de médio aumento (200X) e os subtipos de linfócitos estão representados em número de linfócitos positivos por campo de grande aumento (400X).

Na variável das infecções fúngicas, quando correlacionada com a interleucina IL8, observamos que os pacientes sem infecção fúngica apresentaram valores maiores de IL8, com um valor de p de 0,004.

TABELA 15 - CAUSAS DE ÓBITO DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE FORAM SUBMETIDOS A TMO

CAUSA ÓBITO (PRIM.)	n	%
DECH	5	20,8
FALHA DE PEGA DO ENXERTO	5	20,8
SEPSIS	4	16,7
INFECÇÃO FÚNGICA	3	12,5
HEMORRAGIA	2	8,3
DVO	1	4,2
PNEUMONIA	1	4,2
INFECÇÃO VIRAL	1	4,2
PROGRESSÃO DA DOENÇA	1	4,2
FALHA CARDÍACA	1	4,2
TOTAL	24	100,0

Legenda: DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro; DVO = doença veno-oclusiva.

A tabela 15 relaciona as causas de óbito dos pacientes do estudo, sendo que a DECH e a falha da pega do enxerto correspondem a 41,6% do total de óbitos.

A tabela 16 correlaciona a sobrevida dos pacientes do estudo com as variáveis clínico-patológicas avaliadas. As duas variáveis que tiveram um p significativo foram de pega do enxerto (0,062) e DECH crônica (<0,001), sendo que os pacientes que tiveram estas duas complicações tiveram sobrevida menor.

TABELA 16 - CORRELACIONA A SOBREVIDA DOS PACIENTES DO ESTUDO COM AS VARIÁVEIS CLINICO-PATOLÓGICAS AVALIADAS:

Variável	Classificação	Sobrevida (dias)						Valor de p*
		n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Gênero	Feminino	13	343,62	49,00	2,00	2524,00	706,70	0,696
	Masculino	11	106,82	68,00	33,00	327,00	98,27	
Re-TMO	Não	18	230,56	49,50	2,00	2524,00	586,52	0,379
	Sim	6	248,67	75,50	45,00	906,00	338,90	
Transfusões pré-TMO	Não	2	88,50	88,50	3,00	174,00	120,92	0,734
	Sim	22	248,41	59,00	2,00	2524,00	550,42	
Tipo de doador	Aparentado	12	387,58	52,00	2,00	2524,00	725,35	0,296
	Não aparentado	12	82,58	65,50	3,00	327,00	84,33	
Compatibilidade HLA	Compatível	13	364,38	82,00	2,00	2524,00	699,65	0,220
	Não compatível	11	82,27	50,00	11,00	327,00	86,82	
Condicionamento pre-TMO	Somente CFA	12	388,75	59,00	2,00	2524,00	724,77	0,238
	CFA + outro	12	81,42	59,00	3,00	327,00	84,67	
Origem da célula	MO	17	290,12	55,00	2,00	2524,00	621,45	0,698
	SC	7	101,43	68,00	11,00	327,00	106,42	
Imunoprofilaxia	MTX + CSA	15	309,20	55,00	3,00	2524,00	654,26	0,549
	Outro	9	111,56	68,00	2,00	532,00	162,49	
Pega do enxerto	Não	8	50,88	54,00	2,00	102,00	34,68	0,062
	Sim	14	372,93	101,00	37,00	2524,00	666,44	
DECH aguda	Não	16	128,56	47,50	2,00	906,00	226,98	0,105
	Sim	8	448,13	101,00	49,00	2524,00	854,09	
DECH crônica	Não	20	75,30	49,50	2,00	327,00	83,34	<0,001
	Sim	4	1034,00	719,00	174,00	2524,00	1037,32	
Infecção Bacteriana	Não	7	203,00	50,00	2,00	906,00	329,27	0,919
	Sim	17	248,29	63,00	3,00	2524,00	600,16	
Infecção Viral	Não	13	126,31	50,00	2,00	906,00	244,79	0,166
	Sim	11	363,64	82,00	43,00	2524,00	732,74	
Infecção Fúngica	Não	13	256,69	45,00	2,00	2524,00	685,77	0,339
	Sim	11	209,55	82,00	43,00	906,00	276,97	

Legenda: SC = sangue do cordão; MO = medula óssea. DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro. CFA = ciclofosfamida. MTX = metotexato. CSA = ciclosporina.

6 DISCUSSÃO

Nos pacientes com Anemia de Fanconi é realizado somente o transplante alogênico pois este apresenta aplasia de medula óssea. Somente

um paciente não fez transfusões. Sabe-se, que o número e transfusões é importante com relação ao risco de aumento de rejeição e aloimunização. No estudo não houve relação entre esta variável e a ausência de pega do enxerto ou DECH (SLICHTER, 1988).

No trabalho, foram utilizadas células de medula óssea (17) e de cordão umbilical (7) para realização de TCTH. Destes pacientes, 23 demonstraram expressão tecidual para a IL 10, sendo que os pacientes que realizaram TCTH de medula óssea obtiveram o valor da interleucina 10 mais elevado, sendo estatisticamente significativo. Como já citado anteriormente, os pacientes que realizam TCTH de células de cordão umbilical apresentam menor incidência de DECH agudo e crônico. No estudo, em 4 pacientes não foram identificados o DECH, inclusive nas amostras pulmonares. Em 3 pacientes, as interleucinas 8 e 17 não ocorreram expressão tecidual.

A redução da intensidade dos regimes de condicionamento foi um marco no TCTH em pacientes com AF e a adição da fludarabina aumentou a probabilidade de pega do enxerto, principalmente nos transplantes que utilizam doadores alternativos. O encaminhamento precoce possibilitou a realização do transplante antes do aparecimento de infecções graves ou do acúmulo de transfusões sanguíneas. (GLUKMAN, 2008). No estudo, todos os pacientes evoluíram para óbito, porém em outros estudos a mudança no regime de condicionamento melhorou a sobrevida após TCTH. Isso associado a tipificação do HLA (MacMILLAN; WAGNER, 2010).

Nos últimos 30 anos, a dose de Ciclofosfamida (CFA) utilizada no regime de condicionamento pré-transplante foi reduzida progressivamente com o objetivo de diminuir a toxicidade e garantir uma pega sustentada do enxerto. Os resultados alcançados neste centro demonstram que um alto índice de pega e uma incidência aceitável de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) podem ser atingidos sem a adição de irradiação no regime preparatório (ZANIS-NETO *et al.*, 2005; BONFIM *et al.*, 2007). Com relação à pega, 14 pacientes apresentaram resultado satisfatório, com uma sobrevida média de 372,93 dias. Nesses pacientes, foi utilizado apenas o regime de condicionamento com ciclofosfamida conforme descrito na tabela 11, apresentando expressão da interleucina 10 mais elevada comparada aos que fizeram outros regimes de condicionamento. Isto pode estar relacionado com a

toxicidade em que os paciente com AF estão mais suscetíveis. Com novos estudos, os regimes de condicionamento com doses de ciclofosfamida estão sendo cada vez menores.

Nos pacientes do estudo que apresentaram menores valores de interleucinas 8, 10 e linfócitos CD8, realizaram menores doses de ciclofosfamida no condicionamento para o TCTH.

As infecções nos pacientes pós TMO ocorrem como resultado direto de um balanço negativo na interação do agente etiológico envolvido – seus mecanismos de virulência e capacidade de causar doença – e da defesa do organismo. Em função da intensa imunossupressão a que o paciente com TCTH é submetido, infecção é a maior causa de morbidade e mortalidade nessa população. A perda de granulócitos circulantes coloca o paciente em risco para infecções precoces. O manejo dessas complicações infecciosas vem sofrendo grandes mudanças nos últimos anos, graças a melhor compreensão dos fatores envolvidos e das estratégias utilizadas para a sua prevenção e controle. Nas amostras pulmonares, foram identificadas três infecções bacterianas e nas culturas apenas uma foi identificada no pulmão. As pneumonias bacterianas são comumente encontradas durante o período neutropênico que antecede a pega de um TMO. A identificação bacteriana é difícil, tanto pelo uso precoce de antibioticoterapia, quanto pela própria caracterização da broncopneumonia. (HACKMANN, 1984). Predominam germes gram-negativos, podendo, porém, ser causada por gram-positivos, especialmente por *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (ETTINGER, TRULOCK, 1991). A ADAM 33 apresentou expressão tecidual imunohistoquímica estatisticamente maior nos pacientes que não obtiveram infecção bacteriana. São necessários mais estudo desta endopeptidase com relação as infecções. Mas, sabe-se da sua importância com o declínio da função pulmonar nos pacientes com asma e hiperssesponsividade brônquica (JONGEPIER et. al., 2004).

Nos dados anatomopatológicos das amostras pulmonares, o resultado mais encontrado foi infecção viral (8 casos).

As infecções pulmonares virais apresentam uma incidência de 20 a 30%, ocorrendo principalmente como uma complicação precoce em menos de 100 dias pós TMO. Os principais vírus causadores são citomegalovírus, herpes

simples e vírus sincicial respiratório. Neste estudo, 6 pacientes apresentaram na cultura citomegalovírus e 2 com herpes simples. A infecção por citomegalovírus ocorre em até 50% dos pacientes submetidos ao TMO, sendo que um terço deles desenvolvem pneumonia (neste estudo, desses 6 pacientes, 1 teve como causa de óbito a pneumonia viral). Os sintomas iniciam entre 6 a 12 semanas após o TMO. Apesar de ter sido a infecção mais encontrada, a análise da expressão imunohistoquímica não revelou qualquer estatisticamente significativo nas comparações entre esta variável e as interleucinas, moléculas de adesão e subtipos de linfócitos estudados. No trabalho de BAURAKIADES et.al. (2014), a expressão imuno-histoquímica do ADAM 28 e 33 foi estatisticamente maior nos casos positivos para vírus.

Existem poucos estudos analisando a relação entre metaproteinases do ADAM 28 e 33 a infecções virais pulmonares. Diferente do estudo citado, os pacientes analisados neste estudo eram imunocomprometidos e realizaram TMO. Uma das principais complicações causadas por infecção viral nos pacientes após TCTH é a pneumonite intersticial e que tem como diagnóstico diferencial a síndrome da pneumonia idiopática. Ela é considerada quando não se isola agente etiológico infeccioso em paciente com dano alveolar intersticial, em paciente com piora do quadro respiratório, tendo muita associação com o regime de condicionamento que levaria a uma toxicidade pulmonar (2 pacientes) (CRAWFORD, 1991). No estudo, 6 pacientes tiveram lesão intersticial encontrados em dados da necropsia pulmonar, sendo isolado vírus em 3 pacientes (adenovírus e citomegalovírus), apenas em 1 paciente foi encontrado pneumonite intersticial causado por fungo.

Infecções fúngicas foram encontradas em 6 amostras pulmonares e em 11 isoladas em cultura. No trabalho, o fungo mais encontrado foi o *aspergillus* (4 pacientes). As infecções fúngicas mais comuns são causadas principalmente por *cândida*, *aspergillus* e *fusarium*. As pneumonias causadas por fungos, pela sua incidência e morbidade, têm-se constituído numa das maiores complicações clínicas nos pacientes submetidos a TMO, chegando a ser responsável por 30% das mortes (CRAWFORD, 1991). O *Aspergillus sp*, é o fungo mais isolado nos pacientes após o transplante, sendo causa comum de pneumonia em 20% dos casos. São reconhecidos 130 espécies de *Aspergillus sp*, sendo o *Aspergillus Fumigatus* o mais comum. Em pacientes submetidos a

transplante alogênico, que foi o caso do estudo, a Aspergilose invasiva tem ocorrência bimodal, com o primeiro pico de incidência ocorrendo durante ou logo depois do período de neutropenia, e o segundo depois dos 100 dias, quando paciente desenvolve DECH crônica, tendo que receber corticosteroide. Na avaliação imunohistoquímica, a expressão tecidual de interleucina 8 esteve aumentada nos pacientes que não apresentavam infecção fúngica ($p < 0,05$).

Dentre as complicações pulmonares não infecciosas, 7 pacientes apresentaram edema pulmonar. O edema pulmonar é uma complicação pulmonar não infecciosa frequente, com incidência de 50% após TMO. Tem sua incidência na segunda semana após transplante, sendo proveniente de doenças cardíacas e não cardíacas.

A hemorragia pulmonar é outra complicação pulmonar pós TMO, cuja incidência permanece incerta. Dos pacientes estudados, 7 foram afetados por essa complicação. Sabe-se que é alta a sua mortalidade, chegando a 80%. (ROBINS, et. al., 1989; SLOANE et. al., 1983). A causa dessa síndrome hemorrágica parece ser multifatorial. Resulta de agressão pulmonar não específica que ocorre durante o condicionamento, a qual se agrava na vigência de trombocitopenia e infecção (FRARE E SILVA, 1996).

A produção de plaquetas é geralmente a última função ser recuperado após o enxerto de medula. Conseqüentemente, a hemorragia pulmonar representa uma complicação precoce significativa, ocorrendo nas primeiras semanas após o transplante. Nas amostras pulmonares, apenas em 6 pacientes foi evidenciado predominantemente com hemorragia pulmonar, sendo que um destes apresentou os valores mais elevados de IL-8, IL-17, adam 28, e também valores aumentados de adam 33 e linfócitos CD20. (LEVINE et.al., 2007). Em 2 pacientes com presença de hemorragia em amostras pulmonares não foram isoladas as causas infecciosas. Como causa de primária de óbito 1 ocorreu pela hemorragia e outro por doença veno-oclusiva hepática (VOD).

A incidência da VOD varia de 5 a 55% e a doença se caracteriza por hepatomegalia ou dor na região do hipocôndrio direito, ganho de peso sem outras causas aparentes e hiperbilirrubinemia, que surgem, na maioria das vezes, até 30 dias após o TCPH. A complicação é decorrente da obstrução não trombótica das vênulas intra-hepática (PATON et.al., 2000).

Como complicação do TMO, 2 pacientes apresentaram Bronquiolite Obliterante (BO). A BO é uma complicação pós TMO que é mais frequentemente diagnosticada entre 6 a 12 meses após TMO, mas já foi diagnosticada em fases precoces. No caso dos pacientes do trabalho com diagnóstico de BO, um teve diagnóstico de BO com 3 meses pós-TMO e outro o diagnóstico foi feito 4 meses após o TMO. Os pacientes tiveram diagnóstico de BO precoce, uma através do diagnóstico clínico e outro por necropsia. Com base nos estudos referidos, pode-se afirmar que 10% dos pacientes que receberam transplante alogênico e desenvolveram DECH crônica tem BO (CRAWFORD,1991). No estudo, 1 paciente, apresentou BO e DECH como causa de óbito. Ambos os pacientes apresentaram sobrevida pós TMO acima de 100 dias (532 e 174 dias).

Apenas 1 paciente apresentou doença veno-oclusiva pulmonar, que é uma complicação rara, mas que pode estar associada com medicamentos no preparo para o transplante de medula óssea. A mortalidade da síndrome é bastante elevada (FRARE E SILVA, 1996).

As citocinas já vêm sendo utilizadas nos estudos com TMO, principalmente relacionado a DECH. Em um estudo, os autores analisaram a relação das interleucinas com DECH agudo, onde demonstraram um aumento sorológico das interleucinas 6 e 10 nestes pacientes (FRARE E SILVA, 1996).

Mas ainda há muitas controvérsias neste assunto, pois enquanto alguns estudos têm mostrado que a produção de determinadas citocinas aumentam em decorrência de episódios de DECH e não é alterada por processos infecciosos, outros mostram que algumas destas citocinas aumentam em decorrência de infecções (FRARE E SILVA, 1996). Alguns autores conseguiram mostrar associações de citocinas com DECH e infecções. Os níveis de IL-6 foram maiores em pacientes com infecção, enquanto que com DECH crônica o nível de IL-10 era maior. Outros mostraram que algumas citocinas aumentaram de forma inespecífica após o condicionamento, reconstituição hematopoiética, DECH e infecção. Neste estudo, as interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 foram encontradas em níveis mais elevados nas amostras com hemorragia pulmonar no anatomopatológico.

Vários trabalhos propõem um papel para IL-17 na proteção contra bactérias e fungos extracelulares, devido a sua capacidade de recrutar

neutrófilos para áreas infectadas. Todavia, logo ficou evidente que IL-17 participa na fisiopatologia de vários modelos de doença autoimune, tais como encefalomielite e artrite autoimunes. Ela estimula a secreção de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) pelos fibroblastos humanos e aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). (NORMANTON, MARTIN, 2013). Mesmo com controvérsias, nos estudos experimentais e clínicos revisados há evidências de que as IL17 estejam implicadas na fisiopatologia da DECH aguda e crônica. Atualmente, leva-se em consideração manifestações clínicas para a sua classificação. (FILIPOVICH et.al., 2005). Ainda assim, a contribuição detalhada de IL17 para DECH não foi completamente esclarecida por esses estudos (NORMANTON, MARTIN, 2013). Neste estudo, os valores da IL-17 foram mais elevados em comparação com todas as outras citocinas. Não houve correlação entre a interleucina 17 a DECH nas amostras deste estudo.

Os linfócitos T CD8 apresentaram valores bem elevados em 2 amostras pulmonares de pacientes que tiveram infecção bacteriana (total de 3 casos).

No trabalho, 8 pacientes apresentaram DECH aguda e 4 DECH crônica. A DECH é considerada, atualmente, um dos maiores obstáculos para o sucesso do TMO alogênico, pois embora exista cada vez mais opções de tratamento e controle, o manejo desse tipo de complicação é muito difícil e nem todos os centros estão aptos para lidar com isso. Os pacientes que apresentam DECH crônica obtiveram uma sobrevida maior, com a média de 1034 dias. Embora esteja associada a menor taxa de recidiva, permanece como a principal causa de morbimortalidade tardia em receptores de TCTH. O frequente acometimento de vários órgãos e o quadro clínico pleomórfico desta condição determinam um manejo multidisciplinar, que inclui, além das especialidades médicas, acompanhamento nutricional, fisioterápico, psicológico, odontológico e social (BOUZAS et.al., 2010).

7 CONCLUSÃO

- A amostra foi caracterizada segundo seus dados demográficos revelando uma população de 24 casos (30 transplantes), predominantemente branca, leve predomínio do sexo feminino, com altas taxas de transfusão pré-transplante e com um índice de Karnofsky/Lansky (performance) pré-transplante bom.
- A amostra foi caracterizada segundo seus dados clínicos relevantes revelando presença de altas taxas de complicações clínicas infecciosas, DECH e complicações pulmonares hemorrágicas.
- A expressão imunohistoquímica tecidual de moléculas de adesão (ADAM 28 e 33), interleucinas (6, 8, 10 e 17) e a contagem dos subtipos de linfócitos TCD3, CD4, CD8 e linfócito BCD20 em amostras pulmonares parafinadas destes pacientes foi realizada, revelando altas taxas de expressão de interleucinas e baixas contagens de linfócitos.
- A expressão tecidual de interleucinas e moléculas de adesão e a contagem de subtipos de linfócitos foi correlacionada com os achados anatomopatológicos e clínicos revelando:
 - Contagens de linfócitos CD8 mais elevados nas amostras dos pacientes onde foram encontrados padrão anatomopatológico infeccioso, seja por vírus, bactéria ou fungo com $p = 0,03$.
 - Expressão das interleucinas 8 e 10 aumentadas nos pacientes que fizeram o condicionamento entre os anos de 1993 a 1998, com $p = 0,03$ e $0,02$ respectivamente.
 - Maior concentração da IL10 no grupo histocompatível (HLA) com um valor de p igual a $0,049$.
 - Os pacientes que receberam somente CFA apresentaram um valor mais alto da IL10 com um p de $0,044$.
 - Os pacientes que receberam células da MO apresentaram um valor maior da IL10, com um p de $0,036$.
 - Aqueles pacientes sem infecção bacteriana tiveram valores mais baixo de ADAM33, com um valor de p de $0,016$.
 - Os pacientes sem infecção fúngica apresentaram valores maiores de IL8, com um valor de p de $0,004$.

8 REFERÊNCIAS

Abbas Abul K., Lichtman; AH, Pillai S. **Cellular and Molecular Immunology**. Vol 6a ed.; 2007.

Abugideiri M, Nanda RH, Butker C, Zhang C, Kim S, Chiang KY, Butker E, Khan MK, Haight AE, Chen, Z, Esiashvili N. Factors Influencing Pulmonary Toxicity in Children Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Setting of Total Body Irradiationbased Myeloablative Conditioning. **International Journal of Radiation Oncology**. 2016; 94(2): 349-59.

Afessa B, Abdulai RM, Kremers WK, Hogan WJ, Litzow MR, Peters SG. Risk Factors and Outcome of Pulmonary Complications After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant. **American College of Chest Physicians**. 2012; 141(2):442-50.

Baurakiades E, Costa Jr. VH, Raboni SM, Almeida, VRT, Larsen KSK, Kohler JN, Gozzo PC, Klassen G, Manica GCM, Noronha L. The roles of ADAM33, ADAM28, IL-13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acuteinfectious pneumonia. **Journal of Clinical Virology**. 2014; 61: 585–589.

Bonfim, CMS. Análise das complicações tardias após o transplante de células-tronco hematopoéticas em pacientes com Anemia de Fanconi. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

Buzney CA, Gottlieb AB, Rosmarin D. Asthma and Atopic Dermatitis: A Review of Targeted Inhibition of Interleukin-4 and Interleukin-13 As Therapy for Atopic Disease. **J Drugs Dermatol**. 2016;15(2):165-171

Castro JR, CG; Gregianin LJ; Brunetto AL. Bone marrow transplantation and cord blood transplantation in children. **J Pediatr** (Rio J) 2001;77(5):345-60

Crawford, SW, Meyers JD. Respiratory diseases in bone marrow transplant patients in respiratory disease in the immunosuppressed host Ed. SHELHAMER J, PIZZO PA, PARRILO JE, MANSUR H. J.B. **Lippincott Company Philadelphia**, 595-623, 1991.

D'Alessio FR *et al*. Enhanced Resolution of Experimental ARDS through IL4-Mediated Lung Macrophage Reprogramming. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2016 Feb 19: ajplung.00419.2015.

Dalle JH, Latour RP. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. **Int J Hematol**. Published online: 12 February 2016

Dreymueller D, Uhlig S, Ludwig A. ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. **American Journal of Physiology**. 2015; 308(4): L325-43.

Elbahlawan L, Srinivasan A, Morrison R. A critical care and transplant-based approach to acute respiratory failure after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 April ; 22(4): 617–626

Epanchintsev A, Shyamsunder P, Verma RS, Lyakhovich A. IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9 are overexpressed in Fanconi anemia cells through a NF- κ B/ TNF- α dependent mechanism. **Mol Carcinog**. 2015;54(12):1686-1699.

Ettinger, NA; Trulock, EP. Pulmonary considerations of organ transplantation. **Am Rev Resp Dis**. 144: 213-223, 1991.

Fan LL, Kozinetz, CA, Deterding RR, Brugman SM. Evaluation of a Diagnostic Approach to Pediatric Interstitial Lung Disease. **PEDIATRICS** Vol. 101 No. 1 January 1998.

Fan LL, Dishop MK, Galambos C, Askina FB, White FV, Langstons C, Liptzin DR, Kroehl ME, Deutsch GH, Young LR, Kurland G, Hagood J, Dell S, Trapnell BC, Deterding RR. Diffuse Lung Disease in Biopsied Children 2 to 18 Years of Age. Application of the chILD Classification Scheme. **AnnalsATS** Volume 12 Number 10, October 2015.

Filipovich H, Weisdorf D, Pavletic S, et.al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. **Biol Blood Marrow Transplant** 2005; 11:945.

Flowers MED, Kansu E, Sullivan KM. Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. **Hematol Oncol Clin North Am** 1999; 13(5): 1091-112.

Frare e Silva RL. **Doença de pequenas vias aéreas em pacientes submetidos a transplante de medula óssea** – experiência de sete casos e revisão de literatura. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna da UFPR. Curitiba, 1996, 99p.

Gasparetto EL, et.al. **Tomografia computadorizada de alta resolução nas complicações pulmonares pós-transplante de medula óssea**. 2005.

Gluckman E et al. Bone Marrow transplantation for Fanconi Anemia. **The American Society of Hematology**, 1995.

González PA, Pacheco R. **Host immunity during RSV pathogenesis**. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(10):1320-1329.

Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. **Expert Rev Hematol**. 2010 June ; 3(3): 285–299.

Higaki M *et al*. Interleukin-10 modulates pulmonary neutrophilic inflammation Induced by cigarette smoke exposure. **Exp Lung Res**. 2015 Dec;41(10): 525-34

Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, Zheng SL, Meyers DA, Bleecker ER, Postma DS. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. **Clin Exp Allergy**. 2004 May;34(5):757-60.

Justo GA, Bitencourt MA, Pasquini R, et al. Immune status of Fanconi anemia patients: Decrease in T CD8 and CD56 dim CD16+ NK lymphocytes. **Ann Hematol**. 2014;93(5):761-767. doi:10.1007/s00277-013-1953-4. Bueno SM,

Korthof ET, Svahn J, Latour RP, Terranova P, Moins-Teisserenc H, Soci G, Soulier J, Kok M, Bredius RGM, Tol MV, Zijde ECM, Pistorio A, Corsolini F, Parodi A, Battaglia F, Pistoia V, Dufour C, Cappelli E. Immunological profile of Fanconi anemia: A multicentric retrospective analysis of 61 patients. **American Journal of Hematology**, 2013.

Levine DS, Navarro OM, Chaudry G, Doyle JJ, Blaser SI. Imaging the Complications of Bone Marrow Transplantation in Children. **RadioGraphics** 2007; 27:307–324.

Machado LN, Camandoni VO, Leal KPH, Moscatello ELM. Transplante de Medula Óssea. Abordagem multidisciplinar. São Paulo: Lemar, 2009.
MacMillan *et al*. Alternative donor hematopoietic cell transplantation for Fanconi anemia. **Blood**. 2015;125(24):3798-3804

Mancuso EV, Rezende NA. Testes de função pulmonar de transplante de medula óssea. **Rev. Port Pneumol** 2006; XII (1): 61-9.

MESQUITA JÚNIOR D, ARAUJO JAP, CASTELAN TTT, SOUZA AWS, CRUVINEL WM, ANDRADE LEC, SILVA NP. Sistema Imunitário – Parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**. 2010;50(5):552-80.

Michelson PH, Goyal R, Kurland G. Pulmonary complications of haematopoietic cell transplantation in children. **Paediatric Respiratory Reviews**. 2007; 8: 46-61.

Normanton M; Martin LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft *versus* host disease **Einstein**. 2013;11 (2):237-46.

Pandya CM, Soubani AO. Bronchiolitis obliterans following hematopoietic stem cell transplantation: a clinical update. **Clin Transplant** 2010: 24; 291-306 DOI: 10.1111/j.1399-0012.2009.01100.x.

Paton EJA, Coutinho MA, Voltarelli JC. Diagnóstico e tratamento de complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoéticas. **Medicina, Ribeirão Preto**, 33: 264-277, jul./set. 2000.

Reinhardt RL, Bando JK, Brandon MS, Cheng I. Divergent expression patterns of IL4 and IL13 define unique functions in allergic immunity. **Nat Immunol**. 2012; 13(1): 58-66.

Ribeiro JD, Fischer GB. Chronic obstructive pulmonary disease in children. **J Pediatr (Rio J)**. 2015; 91 (6 Suppl 1): S11-S25.

Schifferli A, Kühne T. Fanconi Anemia: Overview of the Disease and the Role of Hematopoietic Transplantation. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2015;37(5): 335-343. doi:10.1097/MPH.0000000000000374.

Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Blood Rev**. 2010 May; 24(3): 101–122.

Slichter SJ. Transfusion and Bone Marrow Transplantation. **Transfusions Medicine Reviews**. Vol 2, No 1 (March), 1988: pp 1-17.

Soulier J. Fanconi anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2011;2011(Figure 1):492-497. doi:10.1182/asheducation-2011.1.492.

Vizoni SL, Visentainer JEL, Sell AM, Souza CA, Lieber SR. Papel das citocinas na imunopatogênese da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008; 30(2):142-152.

Xuan Y, Wang L, Zhi H, Li X, Wei P. Association Between 3 IL-10 Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease Risk: Systematic Review With Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Medicine*. 2016; 95(6):e2846 Yu, J. Postinfectious bronchiolitis obliterans in children: lessons from bronchiolitis obliterans after lung transplantation and hematopoietic stem cell transplantation. **Korean J Pediatr**. 2015; 58(12): 459-465.

ANEXO 1

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES DE LESÃO E RESPOSTA CELULAR E TECIDUAL EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Pesquisador: Lúcia de Noronha

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1 **CAAE:** 34426514.2.3002.0096 **Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR **Patrocinador Principal:** Associação Paranaense de Cultura - PUCPR

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.947.072

Apresentação do Projeto:

Denomina-se transplante de medula óssea (TMO) ao procedimento terapêutico onde após a aplasia medular é administrado uma infusão de células do tecido hematopoiético com a finalidade de restabelecimento da hematopoiese. O transplante de células progenitoras hematopoéticas consiste na transferência destas células pluripotentes do doador para o receptor, as quais têm a capacidade de renovação contínua e de gerar progenitoras para as células maduras que constituem o sangue e o sistema imune. Após o TMO os pacientes transplantados apresentam diversas alterações decorrentes do processo de transplante. Biomarcadores podem ser utilizados para a busca de associações entre uma dada doença, e/ou suas complicações. Além disso, os biomarcadores, além de permitir a identificação de indivíduos de maior risco ao seu desenvolvimento, contribuem para ajudar a decifrar a heterogeneidade etiológica da mesma na elucidação da patogênese relacionada com o TMO. Estudo retrospectivo que utilizará para a seleção de blocos de parafinas oriundos de necropsias de pacientes que foram atendidos no serviço de transplante de medula óssea do Hospital de Clínicas de Curitiba da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Será realizada a construção de blocos multiamostrais (ou blocos em tissue microarray = TMA) retirados de áreas específicas dos blocos originais (blocos-doadores) e organizadas em blocos de parafina multiamostrais (blocos receptores). Para identificar os biomarcadores de lesão e resposta tecidual serão utilizados anticorpos monoclonais. O protocolo de imunohistoquímica utilizará incubação dos anticorpos primários por 1 hora, em câmara úmida e temperatura ambiente. O anticorpo secundário (DAKO ADVANCETM HRP SYSTEM, DakoCytomation, Inc., CA, USA) será incubado com o material por 30 minutos. Para a revelação, será adicionado complexo 2, 3, diminobenzidina mais substrato peróxido de hidrogênio, por 3 minutos. As lâminas de TMA imunocoradas serão submetidas à leitura, por microscópio óptico BX50 Olympus, em aumento de 40 vezes sem a informação prévia dos resultados de positividade viral e de dados clínicos.

O DNA dos indivíduos será obtido a partir de cortes parafinados dos respectivos blocos utilizando-se um kit de extração de DNA para material parafinado comercialmente disponível seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após o processo de extração do DNA das células da mucosa bucal, o restante do DNA após ser utilizado para o processo de genotipagem, poderá ser utilizado para a amplificação de outros genes. Portanto esse material genético será armazenado em freezer a -20 °C, cada qual contendo um código correspondente, somente acessado pelos pesquisadores responsáveis. Os polimorfismos alvo (Tag SNPs) nos genes dos biomarcadores de lesão e resposta tecidual propostos serão escolhidos com base no International HapMap Project (<http://www.hapmap.org>, 2013). Os Tag SNPs são os polimorfismos-chave que representam os genes candidatos como um todo, considerando bins (blocos de desequilíbrio de ligação calculados por r^2). O DNA purificado dos pacientes será amplificado no aparelho 7500 RealTime PCR System pela técnica de PCR em tempo real utilizando a tecnologia TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) para a identificação dos polimorfismos e a consequente genotipagem.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

- investigar a associação entre biomarcadores de lesão e resposta tecidual e os padrões clínicos, epidemiológicos e etiopatogênicos em pacientes submetidos ao TMO.

Objetivo secundário:

- realizar a caracterização das amostras estudadas de acordo com o gênero, faixa etária, padrão histopatológico da doença;

- realizar uma avaliação da expressão imunoistoquímica tecidual de biomarcadores de lesão e resposta tecidual em amostras parafinadas de tecidos de pacientes que receberam o TMO e correlacionar estes achados com as variáveis clínicas dos casos. - realizar uma avaliação da expressão genética de biomarcadores de lesão e resposta tecidual em amostras parafinadas de tecidos de pacientes que receberam o TMO e correlacionar estes achados com as variáveis clínicas dos casos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O pesquisador declara que não existem riscos da pesquisa, pois trata-se de um estudo retrospectivo que utilizará blocos de material parafinado. Benefícios: Os participantes não terão benefício direto, pois já foram a óbito, somente contribuirão para um melhor entendimento dos aspectos relacionados com o transplante de medula óssea em prol da coletividade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda ao estudo original analisado pelo CEP da Puc - PR. A justificativa para esta emenda está na Inclusão de novos pesquisadores Inclusão do Hospital das Clínicas da UFPR como instituição coparticipante e a Extensão do cronograma de 2016 até 2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

a carta de autorização da instituição Co-participante está presente assinada e datada pelo gerente de ensino e pesquisa. Também estão presentes as cartas emenda assinada e datada pela pesquisadora, o link da plataforma Lattes dos novos pesquisadores e a carta de alteração do cronograma.

Recomendações:

Incluir nos riscos o respeito ao sigilo e confidencialidade ao material do participante (mesmo que óbito). Remover dos benefícios: " participantes não terão benefício direto, pois já foram a óbito"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Quanto à viabilidade de execução nas dependências do CHC, o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional No 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 17 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

Renato Tambara Filho (Coordenador)
