

MARGARETH BATISTELLA ARAÚJO

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Margareth Batistella Araújo**.
Campinas, 30 de janeiro de 2004.


+ Prof(a). Dr(a). Maria Helena Stangler Kraemer
Orientador(a)

***CORRELAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DO
MICROQUIMERISMO DO SANGUE PERIFÉRICO E
IMPACTO DOS FATORES IMUNOGENÉTICOS EM
PACIENTES BRASILEIROS APÓS O TRANSPLANTE
DE FÍGADO***

CAMPINAS

2004

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE**

200413740

MARGARETH BATISTELLA ARAÚJO

***CORRELAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DO
MICROQUIMERISMO DO SANGUE PERIFÉRICO E
IMPACTO DOS FATORES IMUNOGENÉTICOS EM
PACIENTES BRASILEIROS APÓS O TRANSPLANTE
DE FÍGADO***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de doutor em Ciências Médicas, área de
Ciências Biomédicas.*

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Helena Stangler Kraemer

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ar15c
V	EX
TOMBO BC/	59594
PROC.	16 P 117104
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bib 7d 322491

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Ar15c

Araújo, Margareth Batistella

Correlação clínica e imunológica do microquimerismo do sangue periférico e impacto dos fatores imunogenéticos em pacientes brasileiros após o transplante de fígado. / Margareth Batistella Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Maria Helena Stangler Kraemer

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

1. Histocompatibilidade. 2. Rejeição de enxertos. 3. Biologia molecular. I. Maria Helena Stangler Kraemer. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Helena Stangler Kraemer

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer

2. Prof. Dr. Altair Jacob Mocelin

3. Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

4. Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi

5. Prof. Dr. Luis Alberto Magna

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/01/04

DEDICO ESSE TRABALHO

às minhas queridas filhas,

Rafaela e Fernanda.

Nas horas de desânimo, quando os obstáculos pareciam atingir o infinito, sempre derramaram apoio, incentivo, alegria e compreensão.

Que um dia eu possa retribuir tanto amor e dedicação.

ao meu marido,

José Carlos.

Meu grande incentivador. Pelo seu constante apoio e por estar sempre ao meu lado, nos momentos mais importantes da minha vida, com amor, carinho e compreensão.

Agradeço especialmente,

*à minha orientadora Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer,
pelo constante incentivo, confiança e por todos os ensinamentos,
pelos quais lhe serei eternamente grata.*

Esta tese contou com o apoio da Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP – UNICAMP) e do Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

A Deus, que nos momentos difíceis ouviu minhas preces e me fez forte para vencer os obstáculos encontrados durante esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela sua inestimável colaboração na viabilização desse trabalho, e que permitiu o acesso junto aos pacientes do Ambulatório de Gastro-Cirurgia do Hospital das Clínicas – UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna, do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela sua colaboração e apoio no estudo estatístico desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi, da Divisão de Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela valiosa cooperação neste trabalho.

Aos Profs. Drs. Altair Jacob Mocelin, Eduardo Antonio Donadi, Luiz Sérgio Leonardi, Luis Alberto Magna, por terem aceito o convite para participar da Banca Examinadora, o que com certeza muito nos honra e valoriza o nosso trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ilka F. Boin, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção e colaboração.

Aos Drs. Gustavo Ribeiro Oliveira, William J. Duca e a Dra. Marília I. Leonardi, residentes de 2000 a 2002 no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, e às enfermeiras Bete e Marina, pela colaboração na obtenção das amostras estudadas e pela atenção que sempre me dispensaram.

Ao Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela infra-estrutura para a realização dessa tese.

Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que possibilitou o desenvolvimento da presente tese de doutorado.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunogenética de Transplante, Artur, Ana Cristina, Vera e Noélia, meus sinceros agradecimentos pelo apoio, estímulo e compreensão nas horas difíceis e pela atenção que sempre me dispensaram.

À Profa. Neife do Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade, atenção e colaboração.

À Dra. Luciana Meireles, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela valiosa ajuda, atenção e amizade.

Às secretárias do Departamento de Patologia Clínica, Silvia, Marlúcia e Regina, pela amizade, carinho e valiosa colaboração em todos os momentos, com brilhantismo e competência.

Ao Christian e a Yvone, por suas sábias competências e esmerado empenho, que contribuíram para enriquecer a formatação final desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho, cujos nomes estão ausentes nesse texto, mas presentes na minha memória e no meu coração.

De forma muito especial agradeço:

Aos pacientes que permitiram ser investigados, que colocaram suas vidas à mostra, por acreditarem que a pesquisa científica pode melhorar o tratamento e levar ao descobrimento da cura.

Aos meus queridos pais Orlando e Clarisse, que sempre me apoiaram em minhas decisões, com bondade, constante presença e lição de vida.

Aos meus irmãos, Luiz Carlos, Ana Maria e Marilene pelo estímulo e amizade constantes, pelo carinho e alegria transmitidos em cada gesto e atitude.

“A Ciência é engrandecida de duas maneiras: pela adição de novos fatos e pela simplificação do que já existe.”

(C. Bernard)

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxvii</i>
1-INTRODUÇÃO.....	41
1.1-A HISTOCOMPATIBILIDADE NA TRANSPLANTAÇÃO.....	43
1.1.1-O Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	43
1.1.1.1-Função do MHC.....	44
1.1.1.2-Organização genética do MHC.....	45
1.1.1.3-Polimorfismo do MH.....	46
1.1.1.4-Herança dos genes do MHC.....	46
1.1.1.5-A apresentação de antígenos para o enxerto.....	47
1.2-TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	48
1.2.1-Indicações para o transplante.....	49
1.2.2-Complicações no transplante de fígado.....	49
1.2.2.1-Rejeições relacionadas à modulação imunológica.....	50
1.2.2.2-Rejeição humoral.....	51
1.2.2.3-Rejeição celular aguda.....	51
1.2.2.4-A rejeição crônica.....	53
1.2.2.5-Patogênese da rejeição – interações celulares.....	54
1.3-ASSOCIAÇÃO ENTRE QUIMERISMO E TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	55
1.3.1-Leucócitos passageiros em transplantes de órgãos.....	56
1.3.2-Quimerismo sistêmico após o transplante de órgãos.....	57
1.3.3-Desenvolvimento do quimerismo no enxerto.....	59
1.3.4-Propriedades funcionais dos leucócitos do doador logo no início após o transplante.....	60
1.3.5-Aspectos funcionais do microquimerismo por um longo período de tempo.....	62
1.3.6-Considerações terapêuticas sobre a indução ativa ou intensificação do microquimerismo alogênico.....	63

1.3.6.1-Perspectivas imunológicas– dados experimentais.....	63
2-OBJETIVOS.....	67
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1-POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	73
3.2-TIPAGEM DOS GENES HLA DE CLASSE II –DRB1 E –DQB1.....	74
3.2.1-Extração e purificação do DNA.....	75
3.2.2-Amplificação do gene HLA-DRB1 e –DQB1 utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR), com primers de seqüência específica (SSP).....	76
3.2.3-Análise do DNA amplificado.....	77
3.2.4-Fotodocumentação e interpretação dos resultados da tipagem por DNA	77
3.2.5-Associação e definição dos alelos HLA de tipagem por DNA.....	78
3.3-TIPAGEM POR <i>NESTED PCR/SSP</i> PARA DETECÇÃO DO MICROQUIMERISMO.....	78
3.3.1-Amplificação da primeira etapa da <i>nested PCR/SSP</i>	78
3.3.2-Condições de amplificação para a <i>nested PCR/SSP</i>	79
3.3.3-Preparação da segunda etapa da <i>nested PCR/SSP</i>	79
3.4-REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA UM PAINEL DE CÉLULAS T CLASSE I E CÉLULAS B CLASSE II, UTILIZANDO-SE A CITOTOXICIDADE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO (CDC).....	80
3.5-DIAGNÓSTICO DE REJEIÇÃO AGUDA.....	81
3.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
4-RESULTADOS.....	83
4.1-TIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1.....	85
4.2-ANÁLISE DO MICROQUIMERISMO DE ALELOS HLA-DRB1 POR <i>NESTED PCR/SSP</i>	85
4.3-MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO APÓS TRANSPLANTE DE FÍGADO	90
4.4-ANÁLISE DO MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO NO SANGUE PERIFÉRICO DE RECEPTORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.	91

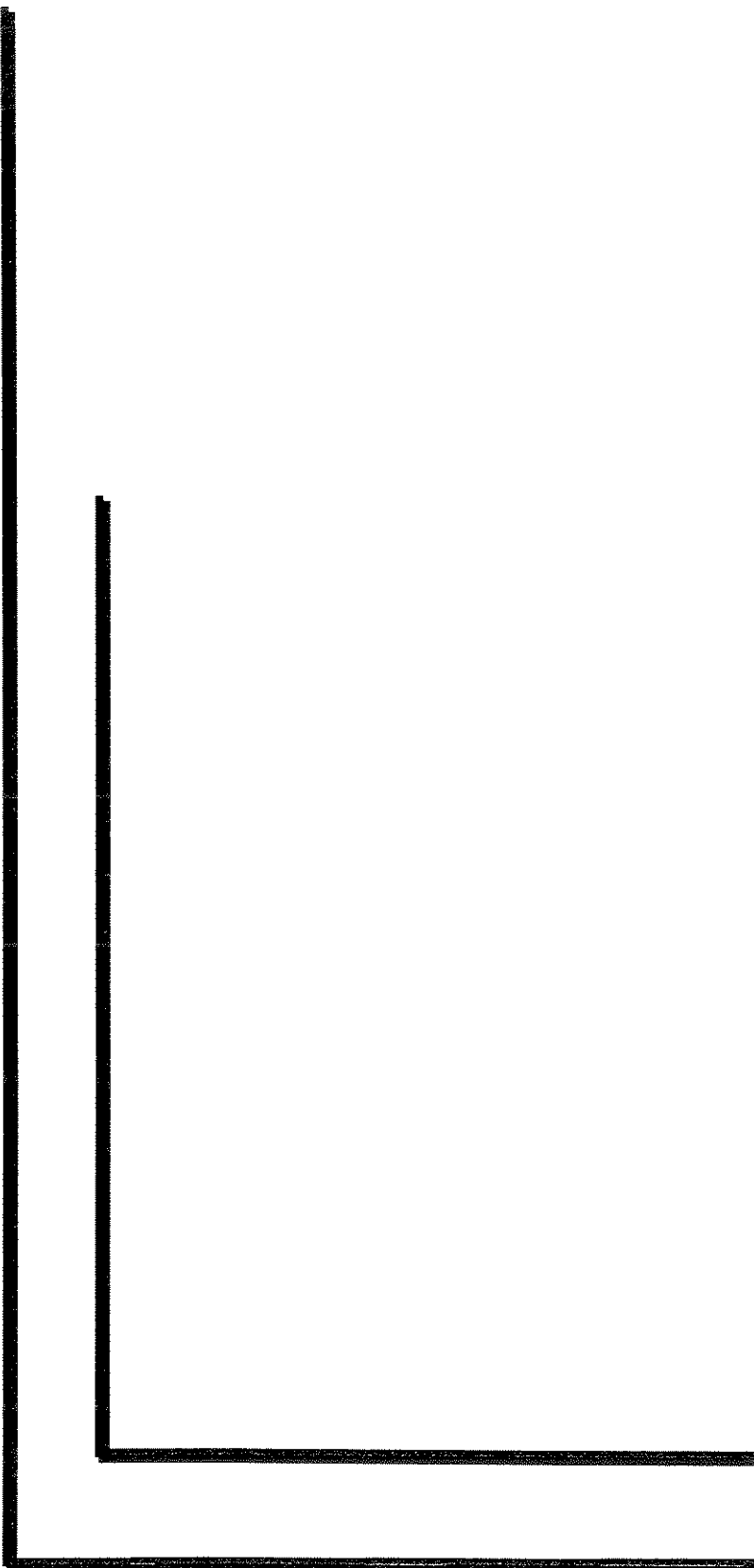
4.5-AVALIAÇÃO DO MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO NOS 50 PACIENTES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	91
4.6-PRESENÇA DO MICROQUIMERISMO E REJEIÇÃO EM RECEPTORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	92
4.7-ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES EM RELAÇÃO AO MICROQUIMERISMO, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	93
4.8-PRESENÇA DO MICROQUIMERISMO E DESIGUALDADES HLA-DRB1 DOS PARES RECEPTORES/DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	94
4.9-ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM MICROQUIMERISMO E SEM REJEIÇÃO EM RELAÇÃO ÀS DESIGUALDADES HLA-DRB1.....	95
4.10-ANÁLISE DAS COMPATIBILIDADES DOS ALELOS HLA-DRB1 E - DQB1 NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	96
4.11-ANÁLISE DAS DESIGUALDADES HLA-DRB1 NA REJEIÇÃO NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	98
4.12-ANÁLISE DAS DESIGUALDADES HLA-DQB1 NA REJEIÇÃO NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	99
4.13-AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1 ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES SADIOS.....	100
4.14-AVALIAÇÃO DE ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1 NOS 50 PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE FÍGADO E 100 CONTROLES SADIOS.....	101
4.15-AVALIAÇÃO DO ALELO DRB1*15 NOS PACIENTES APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	102
4.16-AVALIAÇÃO DO ALELO HLA-DRB1*15011 ENTRE OS PACIENTES MORTOS E VIVOS.....	103

4.17-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO EM RELAÇÃO AO ALELO DRB1*15011.....	105
4.18-DETERMINAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE I NOS PACIENTES PRÉ E PÓS-TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	106
4.19-DETERMINAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE II NOS PACIENTES PRÉ E PÓS-TRANSPLANTE DE FÍGADO.....	106
4.20-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO, EM RELAÇÃO AOS SEXOS MASCULINO E FEMININO.....	108
5-DISCUSSÃO.....	109
6-CONCLUSÕES.....	123
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
8-ANEXOS.....	147

	PÁG.
TABELA 1- Características dos 50 pacientes estudados no pré-transplante de fígado.....	74
TABELA 2- Análise de alelos HLA-DRB1 nos pares receptores e doadores, e detecção de microquimerismo alogênico em 50 pacientes após o transplante de fígado.....	87
TABELA 3- Correlação entre a presença, ou ausência, de microquimerismo de 10 dias a 16 meses, após o transplante de fígado, e os episódios de rejeição em 50 receptores.....	89
TABELA 4- Desigualdades HLA-DRB1 e detecção do microquimerismo alogênico.....	90
TABELA 5- Presença de alelos HLA-DRB1 e -DQB1 nos receptores e doadores e número de desigualdades entre os dois grupos avaliados.....	97
TABELA 6- Distribuição das frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA-DRB1*, -DRB3*, -DRB4*, -DRB5* e -DQB1* nos pacientes submetidos ao transplante de fígado e no grupo controle.....	101
TABELA 7- Receptores de transplante de fígados, vivos e mortos, com a presença de alelo HLA-DRB1*15.....	104

	PÁG.
FIGURA 1- Análise em gel de agarose dos produtos das reações de amplificação por nested PCR/SSP.....	86
FIGURA 2- Presença e ausência de microquimerismo durante um período de 10 dias a 480 dias (16 meses) em receptores, após transplante de fígado.....	91
FIGURA 3- Presença do microquimerismo alôgênico.....	92
FIGURA 4- Presença do microquimerismo e rejeição.....	93
FIGURA 5- Presença do microquimerismo alôgênico e tempo de sobrevida.....	94
FIGURA 6- Presença de microquimerismo e desigualdades HLA-DRB1.....	95
FIGURA 7- Tempo de sobrevida dos pacientes em relação às desigualdades HLA-DRB1.....	96
FIGURA 8- Análise das desigualdades HLA-DRB1 nos pares receptores/doadores correlacionados com a rejeição.....	99
FIGURA 9- Análise das desigualdades HLA-DQB1 nos pares receptores/doadores correlacionados com a rejeição.....	100
FIGURA 10- Frequências dos alelos HLA-DRB1, -DQB1 entre os pacientes e os controles sadios.....	102
FIGURA 11- Frequência do alelo HLA-DRB1*15 nos pacientes após o transplante de fígado.....	103
FIGURA 12- Avaliação do alelo HLA-DRB1*15011 entre os pacientes mortos e vivos.....	104
FIGURA 13- Tempo de sobrevida dos pacientes após o transplante de fígado que possuem, ou não, o alelo DRB1*15011.....	105

FIGURA 14-	Detecção de Anticorpos Anti-HLA de Classe I na fase pré e pós-transplante nos 50 pacientes estudados.....	106
FIGURA 15-	Detecção de Anticorpos Anti-HLA de Classe II na fase pré e pós-transplante nos 50 pacientes estudados.....	107
FIGURA 16-	Tempo de sobrevida dos pacientes após o transplante de fígado, com relação aos sexos masculino e feminino.....	108



RESUMO

Introdução – No transplante de fígado, numerosos estudos demonstraram o microquimerismo alógeno. As implicações clínicas e imunológicas permanecem inconclusivas. Por outro lado, a influência das desigualdades HLA e a aloreatividade do doador são, igualmente, conflitantes. Na base desses dados controversos, esse trabalho analisou a presença do microquimerismo alógeno no transplante de fígado e investigou, prospectivamente, a cinética dos leucócitos do doador relacionados a episódios de rejeição. Estendeu-se esse estudo para determinar a influência dos fatores imunogenéticos nos pacientes após o transplante de fígado.

Métodos – Foram analisadas, a presença de microquimerismo alógeno, a influência dos alelos HLA e os anticorpos anti-HLA doador- específico envolvendo 50 pares doador/receptor por três anos e dois meses. As análises foram realizadas no sangue periférico do receptor. O DNA foi extraído das amostras e a tipagem dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 foi realizada pelas reações em cadeia da polimerase, utilizando-se primers sequência específica (PCR/SSP) e a análise do microquimerismo por nested PCR/SSP. O teste de Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC) foi utilizado para determinar a reatividade de Anticorpos contra um painel de células T e B (PRA)

Resultados – O microquimerismo foi detectado em 72% dos pacientes e o efeito do microquimerismo nos episódios de rejeição foi significativo ($p=0,002$), enquanto o efeito das desigualdades HLA não se mostrou significativo com uma ou duas desigualdades ($p=0,98$). Receptores com HLA-DRB1*01($p=0,002$), DRB1*04 ($p=0,003$ e DQB1*03 ($p=0,002$) mostraram diminuição das frequências, quando comparadas com indivíduos controles. Os receptores com o alelo HLA-DQB1*02 ($p=0,04$) mostraram aumento desse alelo em relação aos controles sadios. E receptores portadores do alelo HLA-DRB1*15011 mostraram um fator de risco altamente significativo ($p=0,007$) no desenvolvimento do transplante de fígado. Finalmente, os efeitos dos anticorpos anti-HLA doador-específico no transplante de fígado não foi evidente.

Conclusões – Esse estudo indicou que o método nested PCR/SSP foi sensível na detecção do microquimerismo alógeno, sendo esse fenômeno observado na maioria dos pacientes estudados. O microquimerismo alógeno esteve associado, significativamente, a episódios de rejeição nos pacientes após o transplante de fígado. A análise das desigualdades HLA demonstrou diminuição de episódios de rejeição em pacientes com maior número de

desigualdades HLA-DRB1 e -DQB1. O alelo HLA-DRB1*15 foi associado ao fator de risco altamente significativo no transplante de fígado e o prolongamento do tempo de sobrevida foi maior nos indivíduos do sexo masculino. Entretanto, será necessária uma investigação mais específica no microquimerismo alogênico e nos anticorpos anti-HLA devido ao fato de determinados genes HLA parecerem desempenhar um papel na natureza e severidade das doenças relacionadas ao transplante de fígado.

ABSTRACT

Background - In liver transplant, a large number of studies has demonstrated allogeneic microchimerism. Clinical and immunological implications remain inconclusive; on the other hand, influence of HLA mismatch and donor alloreactivity also remain conflicting. On the basis of these controversial data, the present study analyzed the presence of allogeneic microchimerism in liver transplant and prospectively investigated donor leukocyte kinetics related to rejection episodes. This study was extended into determining the influence of immunogenetic factors in patients after liver transplant.

Methods - Presence of allogeneic microchimerism, influence of HLA alleles and donor specific anti-HLA antibodies were analyzed involving 50 donor/recipient pairs during a period of three years and two months. Analyses were carried out in peripheral blood of recipients. DNA was extracted from the samples and typing of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles was obtained by Polymerase Chain Reaction using Sequence-Specific Primer (PCR/SSP). Microchimerism was identified through nested PCR/SSP. The Complement-Dependent Cell Cytotoxicity (CDC) test was used to determine Panel Reactive Antibodies (PRA) of T and B cells.

Results - Microchimerism was detected in 72% of patients and the effect of microchimerism on rejection episodes was found to be significant ($p=0.002$), while the effect of HLA mismatch did not show to be significant, with one or two mismatches ($p=0.98$). Recipients with HLA-DRB1*01 ($p=0.002$), DRB1*04 ($p=0.003$), and DQB1*03 ($p=0.002$) alleles showed decreased frequencies when compared to control individuals. Recipients with the HLA-DQB1*02 allele ($p=0.04$) showed an increase of that allele in relation to healthy controls. Further, recipients carrying the HLA-DRB1*15011 allele showed a highly significant risk factor ($p=0.007$) in relation to development of liver transplantation. Finally, effects of donor specific anti-HLA antibodies on liver transplant were not evident.

Conclusion - The present study showed that the nested PCR/SSP method was sensitive in detection of allogeneic microchimerism, and that phenomenon was observed in the majority of examined patients. Allogeneic microchimerism was significantly associated to rejection episodes in post liver transplant patients. Analysis of HLA mismatch demonstrated a decrease in rejection episodes in patients with a larger number of HLA-DRB1 and -DQB1 mismatches. The HLA-DRB1*15 allele was associated to a highly significant risk factor in

liver transplantation and survival time extension was greater in male patients. However, a more specific investigation of allogeneic microchimerism and anti-HLA antibodies is necessary, due to the fact that certain HLA genes seem to play a role in the nature and severity of diseases related to liver transplantation.

1- INTRODUÇÃO

1.1-A HISTOCOMPATIBILIDADE NA TRANSPLANTAÇÃO

1.1.1-O Complexo Principal de Histocompatibilidade

Os tecidos transplantados de um doador não relacionado são, normalmente, destruídos pelo sistema imune do receptor porque as células do doador, nos tecidos, expressam moléculas de superfície celular que diferem daquelas presentes no receptor. A compatibilidade imunológica entre o doador e o receptor é mediada por essas moléculas de superfície, algumas das quais são codificadas no complexo principal de histocompatibilidade (CPH, do inglês MHC: denominação na literatura nacional e internacional, utilizada na presente introdução). Os antígenos do MHC são, normalmente, os responsáveis pelo início precoce da rejeição aguda do enxerto, enquanto numerosos antígenos menores, não codificados no MHC, tendem a estimular uma resposta mais tardia (TROWSDALE et al., 1991).

Embora as moléculas MHC tenham sido descobertas no contexto dos transplantes e, inicialmente, referidas como antígenos de transplantação, sua influência na rejeição do enxerto reflete, meramente, o papel central dessas moléculas na apresentação de antígenos para linfócitos T. As observações iniciais na discriminação entre o tecido “próprio” e “estranho” foram realizadas nos estudos pioneiros de GORER et al. (1937), usando enxertos de peles e tumores de camundongos. Os maiores estímulos para a rejeição de tecidos “não próprios” foram mapeados na região do MHC, conhecida como H-2 no camundongo, localizada no cromossomo 17. A caracterização das moléculas de superfície codificadas no MHC e responsáveis pela rejeição dos enxertos tem sido favorecida pelo uso de aloanticorpos (produzidos em linhagens congênicas) de camundongos imunizados com células de linhagens desiguais para os genes do MHC e por técnicas de química de proteínas e biologia molecular. Técnicas similares também foram empregadas para caracterizar as moléculas de superfície nos humanos, conhecidas como antígenos leucocitários humanos (HLA), codificados no braço curto do cromossomo 6, posição 6p21.3 (VAN ELS et al., 1992).

O transplante é, geralmente, definido como a transferência de um órgão ou tecido de um indivíduo para outro, com a rara exceção de transplantes entre gêmeos monozigotos (transplantes singênicos), os dois indivíduos envolvidos são geneticamente

diferentes (transplantes alogênicos). Independente do complexo MHC, muitos outros genes, normalmente, diferem entre o doador e o receptor, porém a sua relevância imunológica ainda não está elucidada. Esses genes são denominados antígenos menores de histocompatibilidade e suas diferenças desempenham papel particular em transplantes de medula óssea, mas também podem influenciar os resultados nos transplantes de órgãos (ACCOLLA et al., 1991).

As diferenças na organização genética entre o doador e o receptor propiciam a presença de células de diferentes origens genéticas nos receptores de transplantes, podendo ser definida como quimera. Assim, cada paciente tendo um aloenxerto é por definição uma quimera. Na prática clínica, entretanto, o termo “quimerismo” é, raramente, usado para descrever a presença de um órgão alogênico e sim, usualmente, para descrever a mistura de células do doador e receptor no sangue, tecidos ou órgãos. Desse modo, o termo “quimerismo” é usado, principalmente, para caracterizar estados nos quais as células do doador migraram para fora do órgão e persistem nos tecidos do receptor ou, estados nos quais as células do doador dentro do órgão foram substituídas pelas respectivas células de origem do receptor (HISANAGA et al., 1996).

1.1.1.1-Função do MHC

As moléculas principais de histocompatibilidade são, proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático, modificadas para formar glicoproteínas no complexo de Golgi e, transportadas para a superfície da célula. Seu transporte para a superfície celular é dependente da ligação de peptídeos que podem ser derivados de antígenos processados. A apresentação desses peptídeos antigênicos na superfície das células pelas moléculas MHC inicia a diferenciação e expansão clonal, para a função efetora da célula T (MONACO et al., 1992).

Uma característica importante das moléculas MHC diz respeito à sua associação com peptídeos, naturalmente, processados, onde o arranjo dos peptídeos presentes nas células apresentadoras de antígenos é prescrito pelas próprias moléculas classe I. Dessa forma, a natureza polimórfica das diferentes especificidades alélicas das moléculas classe I e II origina uma profusão de fragmentos peptídicos, os quais são capazes

de uma eficaz associação com as moléculas do MHC, na fenda de ligação do peptídeo (RUDENSKY et al., 1992). O polimorfismo do MHC aumenta a amplitude de antígenos que, potencialmente, podem se ligar aos antígenos classe I e II, resultando desse modo em respostas imunes, mais efetivas e compreensivas (CHICZ et al., 1992). Essa análise da ligação entre peptídeos processados, naturalmente, e a moléculas do MHC foi possível por técnicas de eluição ácida, cromatografia líquida de alta pressão e micro seqüenciamento (FALTK et al., 1991). As informações adquiridas desses métodos vêm fornecendo um discernimento notável para os mecanismos na geração e apresentação de peptídeos (RAMMENSEE et al., 1989).

1.1.1.2-Organização genética do MHC

Os genes do MHC exibem algumas características interessantes. Existem duas classes de genes MHC e três genes principais em cada classe. O MHC codifica a produção de proteínas, que nos humanos são denominadas de antígenos leucocitários humanos (HLA). Os genes classe I codificam os antígenos HLA-A, B e C, e os genes classe II codificam os antígenos HLA-DP, -DQ e -DR (BODMER et al., 1997). Cada indivíduo pode ter dois diferentes alelos para cada gene. Esses alelos se expressam concomitantemente. Isto é, cada um dos alelos pode codificar uma molécula de proteína do MHC diferente, que poderá ser expressa na superfície da célula. Na população, existe um grande número de alelos diferentes, os quais são traduzidos para muitas proteínas diferentes, resultando em alto grau de polimorfismo (PARHAM et al., 1988). E as diferenças polimórficas estão localizadas nas seqüências de aminoácidos que determinam a estrutura do sítio de ligação (TAUROG e EL-ZAATARI, 1988). Diferentes moléculas MHC têm diferentes estruturas no sítio de ligação, diferentes especificidades e, portanto, ligam diferentes grupos de peptídeos (PARHAM et al., 1988).

É importante mencionar que cada indivíduo pode herdar somente dois alelos (um de cada um dos pais) para cada um dos três genes de classe I, e dois, para cada um dos três genes de classe II. O alto grau de polimorfismo é encontrado na população, e não no indivíduo (PARHAM et al., 1988).

1.1.1.3-Polimorfismo do MHC

O alto nível de polimorfismo confere uma significativa vantagem evolucionária na proteção da população contra infecções (PARHAM et al., 1996). Infelizmente, o sistema imune não evoluiu para facilitar a transplantação. Claramente, no alto nível de polimorfismo, a maior dificuldade reside em encontrar pares, de doadores e receptores, geneticamente semelhantes, para reduzir ou eliminar os problemas da rejeição no transplante (PARHAM et al., 1996).

Existem evidências de que quanto maior as semelhanças entre o MHC do doador e do receptor (o maior número de alelos em comum), mais diminuem os problemas com a rejeição, propiciando uma melhor sobrevida após o transplante. Os genes do MHC não possuem um polimorfismo equivalente, sendo o HLA-B o mais polimórfico dos genes classe I. Até o momento, já foram identificados 286 alelos diferentes na população; seguido de HLA-A (144 alelos) e HLA-DR (226 alelos), os mais polimórficos dos genes classe II. Similarmente, os genes HLA não são igualmente expressos na superfície da célula (BODMER et al., 1997).

Inicialmente, a tipagem tecidual utilizou métodos sorológicos que se diferenciam das diversas formas de proteínas HLA. Esses métodos têm sido suplementados pela aplicação da genética molecular, mais recentemente pelo uso corrente de técnicas de reações em cadeia da polimerase (PCR). Esses métodos identificam diferenças no DNA de alotipos diferentes. É evidente que a genotipagem é muito mais precisa, possibilitando a detecção de pequenas diferenças nas seqüências de nucleotídeos, as quais formam o código para os aminoácidos polimórficos que caracterizam as especificidades do sítio de ligação de peptídeo da molécula HLA (ROOD et al., 1991; PARHAM et al., 1988; PARHAM e OHTA, 1996).

1.1.1.4-Herança dos genes do MHC

Os genes do MHC são “intimamente ligados”, isto é, estão localizados muito próximos (em um complexo) no mesmo cromossomo – o braço curto do cromossomo 6. Durante a meiose, existe somente uma pequena chance de ocorrer um “cross-over” entre

genes. Assim eles são, usualmente, herdados em bloco. Havendo uma chance de um em cada quatro de que os irmãos possam ter os mesmos alelos HLA.

1.1.1.5-A apresentação de antígenos para o enxerto

O complexo trimolecular que envolve a associação do receptor da célula T (TCR), moléculas MHC e a ligação com o peptídeo processado constitui a chave antígeno-específica, de interação cognitiva, para o início de uma resposta imune (GARCIA et al., 1996).

Para que a célula T seja ativada, os antígenos do enxerto precisam ser processados para formar peptídeos. Esses são, então, apresentados para a superfície celular pelas moléculas MHC, ativando a expansão clonal das células que serão capazes de reconhecer o complexo peptídeo e MHC (POTTER et al., 1989). As células apresentadoras de antígenos, positivas para moléculas classe II do hospedeiro, podem processar antígenos do enxerto pela via exógena de forma similar ao processamento de outros antígenos estranhos como bactérias. Essa via é conhecida como apresentação indireta dos antígenos do enxerto. Essa é a convencional resposta “restrição ao próprio”, na qual células T e células apresentadoras são da mesma especificidade MHC: ambas são células do hospedeiro. Entretanto, tem sido observado que a resposta célula-T para antígenos de enxertos alogeneicos é especialmente vigorosa. Aparentemente, as células T do hospedeiro são ativadas diretamente por peptídeos apresentados pelas moléculas MHC, expressas na superfície das células do enxerto (STEINMAN e WITMER, 1978). Em um aloenxerto, essa é uma alo-resposta para alo-MHC e não é “restrita ao próprio” (LECHLER e BATCHELOR, 1982).

É importante lembrar que no seu desenvolvimento, as células T são testadas no timo, por sua habilidade de reconhecer o MHC “próprio”. Aquelas capazes para esse reconhecimento são positivamente selecionadas e conduzidas para formar células T periféricas maduras. Isso não impede a possibilidade de elas, também, reconhecerem outras aloespecificidades, simplesmente, pelo fato de elas não terem sido testadas contra outras especificidades. O transplante é uma das poucas ocasiões em que as células T são desafiadas pelas alo-moléculas do MHC (ZHOU et al., 1991).

Na rejeição ao transplante, ocorre uma vigorosa resposta: célula T. Células T CD4⁺ do hospedeiro respondem para peptídeos apresentados por alo-moléculas classe II, no enxerto, ou em células passageiras MHC, classe II positivas, tais como células dendríticas, contidas no enxerto. Tem sido sugerido que células passageiras passam para os órgãos linfóides secundários, onde ativam a expansão clonal de células T, e então retornam para o enxerto para realizar suas funções efectoras, sendo que somente uma pequena população de células expressa moléculas classe II. E a resposta, célula T induzida pelo enxerto, pode ser parcialmente determinada pelo seu conteúdo de células classe II positivas (SCHWARTZ, 1990). Células T CD8⁺ do hospedeiro são capazes de reconhecer peptídeos apresentados por alo-moléculas classe I na superfície de células do enxerto, resultando na sua lise. Essas respostas resultam na apresentação direta de antígenos do enxerto pelas moléculas MHC na superfície de células do enxerto para linfócitos T de hospedeiro (ROSENBERG, 1993; KREIGER et al., 1996).

Alo-respostas resultam também de reações cruzadas pelas células T do hospedeiro que estão sendo positivamente selecionadas no timo para reconhecer antígenos estranhos presentes no “MHC próprio”. Alo-moléculas do enxerto podem ter sítios de ligação com o peptídeo, com diferentes estruturas e, portanto, com diferentes especificidades. Logo, elas apresentam um grupo completamente diferente de peptídeos, mesmo quando esses são derivados de proteínas idênticas. Essa apresentação de diferentes peptídeos pelas alo-moléculas do enxerto resulta na ativação de um grande número de clones de células T do hospedeiro (ROTZSCHKE et al., 1991).

1.2-TRANSPLANTE DE FÍGADO

O entendimento do quanto o fígado é um órgão enigmático, sob uma perspectiva imunológica, é de grande significado na transplantação, em particular no delineamento de novas estratégias para reduzir a terapia imunossupressora relacionada à morbidez e mortalidade e, eventualmente, para a completa retirada da imunossupressão (WOOD e SACHS, 1996)

MOORE e STARZL (1959) foram os primeiros a mostrar, por meio de programas experimentais, que o transplante hepático, em cachorros, era possível e que o fígado transplantado podia manter sua função, até ser rejeitado. Posteriormente, cachorros

tratados com azatioprina apresentaram um prolongamento no tempo de sobrevida. Nessa mesma época, STARZL et al. (1963) realizaram o primeiro transplante de fígado, em humanos e, na Europa, CALNE iniciou seu próprio programa clínico em 1968. O próximo marco importante foi a introdução do conceito de morte cerebral, em 1976. Nessa mesma época, um outro grande avanço, nos transplantes clínicos, ocorreu com a introdução, em 1979, da ciclosporina A, um dos produtos derivados de fungo (CALNE et al., 1969). Mais recentemente, o uso do imunossupressor FK506 (Tacrolimus) resultou em um maior controle dos processos da rejeição. Desde então, um número de outros agentes tem sido usado, tanto nos transplantes experimentais quanto clínicos.

O sucesso dos transplantes de fígado resultou no uso corrente desse procedimento em doenças terminais do fígado, sendo a sobrevida de um ano em 50% dos pacientes, de cinco anos em 70 a 90% (SCHLITT et al., 1993; RICHTER et al., 1994). Entretanto, essa porcentagem de sobrevida depende da causa original da doença e do estado de saúde de receptor no momento do transplante, sendo que, no período inicial após o transplante, a morbidez e a mortalidade podem resultar de problemas técnicos. Excelentes resultados são também obtidos com a redução do tamanho do enxerto e quando existem poucas desigualdades entre o doador e o receptor (RICHTER et al., 1994).

1.2.1-Indicações para o transplante

Virtualmente, todas as classes de doenças parênquimais do fígado são indicadas para o transplante hepático, com indicações mais comuns para: cirrose biliar primária, cirrose como resultado da hepatite C crônica e cirrose criptogênica, existindo uma contra indicação para tumores, devido à não-aceitação e altos riscos de recorrência, das doenças parenquimais. Mais recentemente, pacientes com deficiência hepática fulminante têm sido beneficiados com o transplante. De maneira similar, uma falha no transplante de fígado, é uma boa indicação para repetir o procedimento (RICHTER et al., 1994).

1.2.2-Complicações no transplante de fígado

Devido à complexibilidade do procedimento, as complicações do transplantes de fígado são muito comuns, elas podem causar danos tanto no enxerto quanto no paciente, ou em ambos. As complicações mais importantes que agem sobre o enxerto são as rejeições

e fatores técnicos relacionados à preservação do fígado, ou ao próprio procedimento cirúrgico. As complicações mais importantes agindo sobre o paciente são as infecções bacterianas e virais (SCHLITT et al., 1993).

1.2.2.1-Rejeições relacionadas à modulação imunológica

A rejeição pode ser definida como um dano ao enxerto causado por uma resposta imunológica do receptor. Em transplantes de rim, ela é classificada, tradicionalmente, como: hiperaguda, aguda e crônica. No caso do fígado, esses termos, não são inteiramente apropriados, uma vez que o tempo para a manifestação pode ser muito diferente da descrição clássica dos enxertos renais (LUDWIG, 1989). Recentemente, foi padronizada uma terminologia internacional para a rejeição de fígado onde os termos preferenciais são: rejeição humoral, celular e crônica (LUDWIG, 1994; International Working Party, 1995).

No transplante de fígado, a prevenção e o tratamento da rejeição têm sido correlacionados com um prolongamento do tempo de sobrevida dos pacientes (DEMETRIS e MARKUS, 1989, GOUW et al., 1987). Uma reação imune do hospedeiro aumenta o risco tanto da rejeição aguda quanto crônica. A rejeição celular aguda é mais comum em pacientes transplantados devido a doenças autoimunes do fígado, tais como: hepatite autoimune e cirrose biliar primária. Tal rejeição celular é menos comum em pacientes transplantados devido à doença alcoólica do fígado e à hepatite infecciosa-vírus B. (WIESNER et al., 1998). Normalmente, a rejeição aguda responde rápida e completamente a um aumento da imunossupressão (BUSUTTL et al., 1994). A sobrevida dos enxertos, após a rejeição aguda, pode ser prolongada devido ao aumento da tolerância (WIESNER et al., 1998).

A rejeição crônica é mais comum em pacientes retransplantados, porém, está associada aos pacientes com cirrose biliar primária e a pacientes do sexo feminino receptores de enxerto de doador do sexo masculino (CANDINAS et al., 1995). Está particularmente associada a danos progressivos dos canais biliares e ao aparecimento de lesões arteriais. Por razões não conhecidas, vem ocorrendo um declínio na incidência de rejeição crônica (SHER et al., 1997). Embora um pequeno número de pacientes com

rejeição crônica tenha um prolongamento no tempo de sobrevida com aumento da imunossupressão, a maioria necessita de um retransplante.

1.2.2.2-Rejeição humoral

A rejeição acelerada hiperaguda, cujo termo foi atribuído a KISSMEYER-NIELSEN et al. (1966) resulta na presença de anticorpos circulantes pré-formados diretamente contra antígenos específicos do doador no interior do enxerto e, por isso, é mais corretamente denominada rejeição humoral. Os anticorpos do grupo sanguíneo ABO são inatos, enquanto a pré-sensibilização para antígenos HLA pode ocorrer não somente de um enxerto prévio, mas também como resultado de transfusões de sangue, ou gravidez. Rejeição humoral no transplante de fígado é rara, mesmo quando os enxertos são realizados entre indivíduos de grupos sanguíneos ABO incompatíveis (GORDON et al., 1986 b), existindo uma convicção que o fígado é relativamente resistente às injúrias mediadas por esses anticorpos (DUQUESNOY, 1989). Essas opiniões foram confirmadas com os primeiros experimentos que utilizaram o rato como modelo para transplante de fígado onde, após a sensibilização, ocorreu uma indução da tolerância e não uma rejeição hiperaguda (KAMADA et al., 1981). No entanto, a rejeição humoral foi muito relatada nos primeiros transplantes (STARZL, 1969). Similarmente, anticorpos linfocitotóxicos podem causar a falha de órgãos em alguns, mas não em todos os pacientes (DEMETRIS et al., 1991). O mecanismo da relativa resistência do fígado para a rejeição mediada por anticorpos não está completamente entendido (DEMETRIS et al., 1991). Entretanto, o fígado, em contraste com outros órgãos sólidos, tanto por razões anatômicas quanto funcionais parece ser relativamente resistente aos danos mediados por anticorpos (WIGHT, 1994 b).

1.2.2.3-Rejeição celular aguda

A definição de rejeição aguda foi sugerida por LUDWIG (1989) e por ele confirmada (1994) é relativamente fácil de definir e quantificar em enxertos experimentais, particularmente quando são usadas linhagens puras congênicas com genes HLA conhecidos e usando controles apropriados. A rejeição celular aguda (RCA) pode ser definida, de uma

maneira geral, como uma inflamação oriunda das disparidades genéticas entre o doador e o receptor. Essa inflamação afeta, inicialmente, os dutos biliares interlobulares e o endotélio vascular, incluindo veias-portas e vênulas hepáticas e, ocasionalmente, artérias hepáticas (DEMETRIS et al., 1997).

A RCA é a reação alogênica mais comum e, clinicamente, significativa do aloenxerto, no início do período pós-operatório, com um tempo médio de oito dias para o seu aparecimento e sua incidência decresce com o tempo após o transplante de fígado. A RCA ocorre em 80% dos transplantes de fígados durante o primeiro ano, enquanto um total de 20% dos pacientes apresentam um segundo e terceiro episódio respectivamente (WIESNER et al., 1998). A identificação imune de fatores de risco para RCA pode tanto representar uma responsividade do hospedeiro quanto resultar de incompatibilidades imunológicas entre doador e receptor, (por exemplo, poucas igualdades HLA-DR) (WIESNER et al., 1998; BERLAKOVICH et al., 1996). Os tratamentos com imunossupressores afetam a incidência para o início da rejeição aguda, por exemplo, pacientes com imunossupressão baseada na ciclosporina tendem a ter mais episódios de rejeição aguda que os pacientes com imunossupressão por Tacrolimus (NEUHAUS et al., 1994; BUSUTTIL, et al., 1994) .

A incidência real da rejeição aguda somente pode ser estabelecida quando a biópsia é realizada frequentemente. Essa incidência apresenta uma grande variabilidade entre os diferentes grupos, porém em sua maioria, ela se refere à rejeição aguda entre 60 a 80% de todos os pacientes (FARGES et al., 1996). A maior parte dos episódios de rejeição aguda ocorre nas primeiras semanas após o transplante, com o pico de incidência entre o 5º e o 14º dia (KLINTMALM et al., 1989). Muito menos comum é a manifestação da rejeição aguda meses após o transplante e quando ela ocorre, normalmente atribui-se a falhas do imunossupressor (BUSUTTIL et al., 1994).

1.2.2.3.1-Histopatologia de rejeição celular aguda

O quadro clínico e laboratorial da RCA é inespecífico, obtendo-se o diagnóstico certo somente com o exame histológico. Dentre os dados clínicos e laboratoriais relevantes destacam-se dor no hipocôndrio direito, febre, eosinofilia e elevação de enzimas canaliculares (GAYOTTO e ALVES, 2001).

As alterações morfológicas celulares agudas compreendem inflamação portal, lesão do epitélio biliar, endotelite e necrose perivenular.

No fígado, o infiltrado inflamatório, em geral, restringe-se aos espaços-porta (hepatite portal). Em casos graves, o infiltrado pode extravasar os limites da placa limitante, apresentando atividade peri-portal e áreas de necrose no parênquima. Trata-se de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos pequenos e ativados (células TCD4+, CD8+, também células B), imunoblastos, plasmócitos. No transplante hepático, a presença de eosinófilos no infiltrado é um importante marcador histológico para o diagnóstico da rejeição.

Sabe-se que as células epiteliais ductais e endoteliais de veias e artérias, por apresentarem forte expressão de antígenos de histocompatibilidade principal classe II, são as iniciadoras do processo. A chamada endotelite ou flebite (venulite) é o mais importante sinal histológico da rejeição. Observam-se linfócitos (CD4+ e CD8+) na superfície endotelial, com tumefação e/ou ruptura do endotélio. Também podem ser observados eosinófilos permeando o endotélio. Em casos de rejeição celular aguda grave, observamos endotelite na veia centro-lobular com áreas de necrose hepatocelular na zona 3 acinar. O epitélio de revestimento dos ductos biliares é também um dos locais preferencialmente lesados pelos linfócitos CD8 (agressão ductal). As alterações lobulares na rejeição são inespecíficas, podendo, ou não, estar presentes. Geralmente, observa-se grau variado de infiltrado inflamatório sinusoidal com características semelhantes ao infiltrado portal (GAYOTTO e ALVES, 2001).

1.2.2.4-A rejeição crônica

A rejeição crônica é uma forma irreversível de rejeição que se manifesta pelo menos 60 dias após o transplante. Ela é definida por duas características histopatológicas principais: vasculopatia obliterativa e perda dos canais biliares (International Working Panel, 1995). A etiologia e fisiopatologia da rejeição crônica não estão claramente entendidas, entretanto, tem sido atribuída tanto pela aloresponsividade do hospedeiro e demais respostas dependentes de antígenos do hospedeiro quanto pela isquemia dos condutos biliares. Estudos *in vitro* em cultura de linfócitos oriundos de aloenxertos de

figado de pacientes com rejeição crônica revelaram uma atividade citotóxica diretamente contra antígenos HLA (MARKUS et al., 1988a). Além disso, análise imunohistoquímica da rejeição crônica mostrou um aumento na expressão de antígenos MHC em estruturas alvos, particularmente células do epitélio biliar. Por esse motivo, parece provável ser esse um importante mecanismo imunológico, conduzindo à rejeição crônica (ADAMS et al., 1994).

A incidência da RC vem diminuindo com o tempo; anteriormente, na década de 1980 a 1990, os relatos apontavam uma incidência de 7,7% a 16,8% (KLINTMALM et al., 1989; O'GRADY et al., 1988), enquanto que de 1995 a 2000, a incidência caiu para 1,5% a 8,0% (FARGES et al., 1996; NEUHAUS et al., 1994). Entretanto, receptores jovens, particularmente infantis, são mais suscetíveis de desenvolver RC. Esse fato pode representar uma baixa resposta imune, associada à idade (WIESNER et al., 1998). Outros fatores do receptor, como a origem (etnia) podem ser importantes na RC, visto que a população africana tem uma alta incidência de rejeição crônica (22%), quando comparada com caucasianos (3.2%) (DEVLIN et al., 1998). Receptores de sexo feminino com doadores de enxerto de sexo masculino podem também ter uma incidência maior de RC.

1.2.2.5-Patogênese da rejeição – interações celulares

A rejeição depende da ação complexa de uma variedade de interações celulares envolvendo, tanto associações celulares, como mediadores solúveis. O extravasamento e a localização das células imunes para o aloenxerto são dependentes do reconhecimento e da interação de moléculas de adesão complementares expressas nos leucócitos e endotélio. Atualmente, as células citotóxicas T CD8+ parecem ser as maiores mediadoras da rejeição do enxerto, uma vez que elas interagem com células T CD4+ e macrófagos. As moléculas alogênicas classe II são as maiores sensibilizadoras da rejeição do enxerto e, no figado, se expressam nas células dendríticas (DEMETRIS et al., 1985). Um outro fator de risco das moléculas alogênicas classe II é sua expressão nas células de Kupffer, onde as moléculas HLA do doador são rapidamente substituídas por aquelas do receptor (GOUW et al., 1987; STEINHOFF et al., 1988). Por outro lado, o figado apresenta grande variabilidade entre os diferentes tipos de células, para a expressão de moléculas HLA classe I. Normalmente, essas moléculas se expressam nas células sinusoidais, endotélio, células de Kupffer, células

dendríticas, epitélio dos condutos biliares, enquanto hepatócitos, não expressam esses antígenos (STEINHOFF et al., 1988).

Atualmente, só as compatibilidades ABO são exigidas para o transplante de fígado. Desse modo, existem diferenças nos antígenos de histocompatibilidades entre o doador e o receptor. A expressão de antígenos MHC é variável entre os diferentes tecidos. No fígado humano, os antígenos HLA de classe I (A,B, C) e classe II (DR, DP, DQ) são fortemente expressos nas células sinusóides, HLA-DR e fraca expressão de antígenos classe I é observada no endotélio vascular. Antígenos de classe I e, ocasionalmente, de classe II, são observados no epitélio biliar. Hepatócitos são, normalmente, negativos tanto para a expressão de antígenos classe I quanto classe II. Observa-se, no entanto, um aumento na expressão de antígenos HLA nos constituintes do fígado, durante os episódios de rejeição, onde os hepatócitos, o epitélio biliar e endotélio vascular apresentam intensa coloração para antígenos classe I e II (GOUW et al., 1987; HÜBSCHER et al., 1990).

Após o transplante, a rejeição aguda é primariamente dirigida pela estimulação aloantigênica direta das células dendríticas do doador e células de Kupffer (SEABERG et al., 1997; FORBES et al., 1986). Posteriormente, as células T do receptor formam, espontaneamente, agrupamentos com as células dendríticas do doador e, em 48 horas, as células T do receptor tornam-se ativadas, secretam citocinas e iniciam a divisão (DEMETRIS et al., 1991). A reação é reconhecida morfológicamente pela transformação blástica de linfócitos, seguido de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células plasmáticas. A análise fenotípica revela uma predominância de linfócitos T CD8+ e diminuição de linfócitos T CD4+ (DEMETRIS et al., 1985; IBRAIM et al., 1993).

1.3-ASSOCIAÇÃO ENTRE QUIMERISMO E TRANSPLANTE DE FÍGADO

Em 1945, OWEN constatou pela primeira vez em bovinos, na gêmea de um bezerro, a presença de dois tipos diferentes de eritrócitos e deduziu, corretamente, que essas células apareceram após uma troca de células embrionárias entre gêmeos dizigotos *in útero*. Além disso, essas células, aparentemente, estabeleceram-se nos tecidos hematopoiéticos e continuaram a prover o hospedeiro com células diferentes das “próprias”. A descoberta desse quimerismo hematopoiético permitiu experimentos subseqüentes que utilizaram,

como modelo, os roedores. Nesses animais, eram introduzidas na hora do nascimento, células hematopoéticas de um doador geneticamente diferente. Os resultados mostraram que esses animais, posteriormente, tornaram-se tolerantes para transplantes desses mesmos doadores (BELLINGHAM, 1971). Acreditou-se que esse fenômeno ocorria devido à eliminação, cedo na vida, de linfócitos neonatais reativos, uma propriedade intrínseca de sistema imune que permite distinguir o “próprio” do “não- próprio”, e o quimerismo descrito na gêmea de um bezerro fora atribuído à tolerância neonatal. Quase 50 anos se passaram até a descoberta do microquimerismo em receptores de transplantes de órgãos, forçando uma análise mais crítica de modelo clínico de rejeição, originalmente descrito por Medawar.

1.3.1-Leucócitos passageiros em transplantes de órgãos

Durante a recuperação dos órgãos de um doador com morte cerebral, esses são geralmente perfundidos com vários litros de solução de preservação através de artérias e veias. Apesar disso, considerável número de leucócitos permanece no órgão e são transferidos para o receptor pelo enxerto. Particularmente, considerável número de linfócitos permanece em dois compartimentos do órgão: o parênquima e o tecido linfático adjacente. Na parte interna do parênquima, os leucócitos são encontrados em grande número, particularmente, em órgãos grandes, como o fígado ou o pulmão (SCHLITT et al., 1993a; RICHTER et al., 1994). O seqüestro dos leucócitos dessa área pode ser iniciado com uma baixa regulação de moléculas de adesão, o que pode ocorrer como resultado do “trauma” ou de uma desregulação geral associada à morte do doador. Os linfócitos dentro do enxerto diferem dos linfócitos do sangue circulante nas populações, predominantemente de células T CD8 e célula natural killer (NK) (SCHLITT et al., 1993b).

Em adição a essas células originalmente derivadas do sangue, o órgão transplantado também contém leucócitos presentes da linhagem monócito/ macrófago e ainda células de Kupffer e células dendríticas. Elas representam 10% de todas as células do fígado e realizam várias funções, incluindo fagocitose, produção de citocinas e processamento e apresentação de antígenos. Como elas mostram forte expressão de moléculas classe I e classe II do doador, bem como diferentes tipos de moléculas

estimulatórias, desempenham um importante papel funcional após o transplante (LOHSE et al., 1996). O perfil funcional dessas moléculas pode contribuir tanto para sensibilização do sistema imune do receptor quanto para indução da anergia (THOMSON et al., 1999; LU et al., 2001). Essas células também podem migrar para dentro e fora do órgão, embora com uma cinética mais lenta daquela dos linfócitos.

O órgão transplantado tem mostrado conter não somente células hematopoiéticas maduras, mas também células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Em transplantes de fígado singênicos em que se utiliza o rato como modelo para receptores irradiados letalmente, ocorre, em geral, a reconstituição do sistema hematopoiético e sobrevivência desses animais. No entanto, os controles não transplantados morrem (MURASE et al., 1997). Dessa forma, estima-se que os enxertos de fígado contenham um número de células precursoras suficientes para a reconstituição completa da hematopoiese, similar ao transplante de medula óssea. Utilizando o mesmo modelo em transplantes de coração, a reconstituição foi observada apenas em poucos casos. Esse conjunto de diferentes tipos de células que se manifestam em grande número, principalmente, no transplante de fígado é referido como leucócitos passageiros.

1.3.2-Quimerismo sistêmico após o transplante de órgãos

Imediatamente após o transplante e reperfusão do órgão alogeneico, leucócitos passageiros começam a migrar para fora do enxerto e a povoar todo o receptor. Após o transplante de fígado, células T do doador podem ser consideradas como mais de 10% de todas as células T no sangue, durante os primeiros dias após o transplante, de maneira similar são detectadas as células NK, enquanto células B se encontram em número menor que 5% (RICHTER et al., 1995).

No máximo de 2-3 dias após o transplante, o número de células do doador decresce, gradualmente, sendo detectada por citometria de fluxo por 2 a 3 semanas após o transplante. Por meio de técnicas muito sensíveis da PCR, células do doador são detectadas no sangue do receptor nos primeiros meses, e, mais tarde, são indetectáveis (UEDA et al., 1997). Em muitos casos, os sinais indicadores do doador permanecem e persistem por décadas após o transplante, embora possam variar com o tempo (SCHLITT et al., 1994a;

ELWOOD et al., 1997). A detecção de moléculas HLA classe II, por transcriptase reversa RNA PCR-RT mostra que esses sinais não representam DNA do doador provenientes de tecidos destruídos, porém células vitais presentes na periferia do receptor. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez por Starzl e colaboradores, e foi denominado de microquimerismo (STARZL et al., 1992a; STARZL et al., 1993a). Devido ao fato de o microquimerismo ter sido detectado inicialmente, em pacientes com transplante de rim ou fígado com sobrevida prolongada e função estável do órgão com ausência de imunossupressão, foi suposto que o microquimerismo estava associado à tolerância, ou, pelo menos, ao aceite do enxerto por um longo período (STARZL et al., 1992a; STARZL et al., 1993b).

Estudos em grande número de pacientes (bem como em modelos que utilizam animais de experimentação) após um transplante de órgão têm indicado que o desenvolvimento do microquimerismo sistêmico caracterizado pela detecção do alotipo de doador por DNA/PCR no sangue, ou em diferentes tecidos, é um fenômeno freqüente. E, com alguma variabilidade, pode ser detectado aproximadamente em 60 a 80% de todos os pacientes após o transplante de órgãos (HISANAGA et al., 1996a). Análise com amostras de sangue para as especificidades do doador por RNA PCR-RT sugerem que para alguns pacientes estudados as células vitais específicas do doador e não somente fragmentos de DNA liberados de tecidos destruídos, estão presentes na periferia do doador. No entanto, para grande maioria dos pacientes, ainda não está claro se a PCR positiva sempre se correlaciona com as células vitais do doador presente no receptor e, mais importante ainda, que células são essas.

Até o presente momento, os estudos demonstraram que a migração de linfócitos passageiros é um fenômeno regulatório após o transplante de órgãos, sendo particularmente acentuado no caso dos transplantes de fígado. A cinética das células do doador (ou detecção do DNA) no sangue, ou tecidos de receptores, indica duas fases separadas do microquimerismo que são detectadas após o transplante de órgãos. A primeira fase (fase I), aproximadamente de 2 a 8 semanas após o transplante, ocorre devido a um número variável de leucócitos passageiros migrantes para fora do enxerto. Particularmente, após o transplante de grandes órgãos como fígado, as células dos doadores podem, realmente, ser detectadas no sangue periférico, ou nos tecidos do receptor. Esse quimerismo que ocorre

mais cedo é verificado, particularmente, para linfócitos que circulam pelo sangue e migram para todas as partes do corpo, bem como para órgãos linfóides secundários (baço e linfonodos), como demonstrado em modelos animais (LARSEN et al., 1990). A fase mais tardia do microquimerismo começa por volta de 3 a 6 dias após o transplante, freqüentemente após um longo período sem microquimerismo periférico detectável. Essa fase é caracterizada por um nível muito baixo de microquimerismo no sangue ou tecidos e é detectada somente por técnicas muito sensíveis da PCR.

1.3.3-Desenvolvimento do quimerismo no enxerto

Semelhante à migração dos leucócitos para fora do enxerto, células hematopoiéticas do receptor deslocam-se para o interior do enxerto. A primeira série é a migração por granulócitos (O'CONNELL et al., 2000), essas células podem fixar-se no endotélio vascular e podem contribuir para perda do órgão. Na segunda série, os linfócitos do receptor podem iniciar a recirculação, através dos tecidos do enxerto, e contribuem tanto para rejeição quanto para a tolerância do órgão (SCHLITT et al., 1992; TIPPNER et al., 2001)

O quimerismo verdadeiro do órgão, entretanto, requer a substituição das células de doador presentes por células específicas do receptor. Essas trocas têm sido estudadas, particularmente, nas células de Kupffer no fígado. No período de algumas semanas ou poucos meses, células provenientes do doador desaparecem do órgão e são substituídas pelas células específicas do receptor. Um fenômeno similar foi sugerido para as células endoteliais em transplantes renais (RICHTER et al., 1994; LOHSE et al., 1996).

Esses fatos indicam que não somente as células derivadas da medula óssea, tais como, linfócitos e monócitos/macrófagos são substituídos no enxerto, ocorrendo uma transferência de outros tipos de células. Dados recentes em pacientes após transplante de fígado, bem como de medula óssea sugerem que inclusive hepatócitos podem ser substituídos pelas células provenientes do receptor, embora em pequenas porcentagens, provavelmente através da diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (THEISE et al., 2000). Todas essas trocas aumentam o grau de um verdadeiro quimerismo no enxerto e podem ter consequências imunológicas, bem como fisiológicas e bioquímicas.

1.3.4-Propriedades funcionais dos leucócitos do doador logo no início após o transplante

Os leucócitos do doador transferidos juntamente com o órgão transplantado podem exercer um amplo espectro de funções imunológicas tanto ativas quanto passivas. De um lado, os linfócitos T passageiros podem ser ativados pelos diferentes antígenos que eles reconhecem no seu novo ambiente. Por outro lado, leucócitos passageiros expressam fortemente antígenos HLA classe I e II, bem como várias moléculas estimulatórias, com forte impacto no sistema imune do receptor. Na prática clínica, os efeitos funcionais dos linfócitos passageiros incluem um número de efeitos indesejáveis, tais como, sensibilização do sistema imune do receptor por células apresentadoras de antígenos, e as reações do enxerto contra o hospedeiro pelas células T deslocadas (LOHSE et al., 1996; LECHLER e BATCHELOR et al., 1982). Entretanto, os leucócitos passageiros também possuem um efeito imunológico benéfico, apresentando uma baixa reatividade contra os antígenos do doador, contribuindo para indução da tolerância, através de uma série de mecanismos, por exemplo, indução da anergia pela apresentação de antígenos por células não especializadas. (LOMBARDI et al., 1996). Concomitantemente, os efeitos da inibição das células T passageiras conduzem a uma baixa regulação da resposta do receptor contra os antígenos do doador, ou à indução de células imunoregulatórias derivadas do receptor (RAMMENSEE et al., 1989; HOLLSBERG et al., 1996; RADDATZ et al., 1998).

Na prática clínica, o impacto funcional dos leucócitos passageiros origina uma somatória de efeitos que incluem as funções já citadas, as quais podem, continuamente ser modificadas por muitos outros fatores, entre eles as diferenças dos genes de histocompatibilidade entre o doador e o receptor e o polimorfismo genético que afeta a produção de várias citocinas. (SATO et al., 1999). Alguns experimentos *in vitro* usando células mononucleares vivas provenientes diretamente de tecido enxertado mostraram que essas células parecem representar uma população particular de células ativas com forte potencial funcional, provavelmente maior que as células mononucleares provenientes do sangue periférico. (SCHLITT et al., 1993a)

Em modelos animais, utilizando roedores, foi demonstrado que poucos dias após o transplante, células dendríticas do doador foram encontradas no tecido linfático do receptor (por exemplo, o baço). Essas células, provavelmente, estão envolvidas na ativação

dos linfócitos específicos do doador. Essa migração de células dendríticas maduras, do enxerto, logo após o transplante, parece ter um papel central no início da resposta imune contra o enxerto, provavelmente iniciando a rejeição aguda (LARSEN et al., 1990). Entretanto, essa migração não é o único caminho de apresentação de antígenos do doador para o sistema imune do receptor. A apresentação pode ocorrer pela via indireta, através das células especializadas apresentadoras de antígenos (APCs), as quais podem captar o antígeno de células eliminadas do enxerto.

Em modelos experimentais, especialmente após o transplante de pâncreas, ou intestino delgado, tem sido demonstrada a reação de enxerto contra hospedeiro (DECH) devido aos leucócitos passageiros. Normalmente, essas complicações são observadas ao redor de 4 a 6 semanas após o transplante, sendo freqüentemente associadas a erupções da pele. Em casos mais severos, pode desenvolver-se uma leucopenia ou trombocitopenia. A consequência mais interessante *in vivo* sobre as propriedades funcionais dos leucócitos passageiros diz respeito ao seu papel na imunomodulação, ou até na indução de tolerância (SCHLITT et al., 1995). Em estudos utilizando modelos animais, onde leucócitos passageiros foram depletados por diferentes estratégias, observou-se que as repostas imunes são, geralmente, baixas. Em transplantes de fígado, as respostas imunes são, geralmente, baixas e, em muitos experimentos animais, incluindo os roedores, a indução da tolerância para o enxerto alogênico desenvolve-se, de modo freqüente, espontaneamente. Em modelos de transplantes de fígado de rato, foi demonstrado, claramente, que a depleção dos linfócitos passageiros do doador com altas doses de irradiação antes da retirada do órgão evita o aceite espontâneo do órgão, que, normalmente, ocorre após o transplante, nas diferentes combinações de linhagens (SUN et al., 1995). Tem sido sugerido que, relativamente, grandes quantidades de leucócitos passageiros no fígado podem contribuir para o efeito promotor de tolerância. Como observado em modelos de porcos após transplante de fígado (CALNE et al., 1969), foi demonstrado, igualmente, que poucas células passageiras têm uma profunda importância na indução da tolerância. Utilizando rato como modelo em transplantes alogeneicos de coração, observou-se que, quando leucócitos passageiros foram efetivamente depletados por um anticorpo monoclonal específico, contra células hematopoiéticas provenientes do doador, no início do pós-transplante, o

desenvolvimento e aceite do órgão por um longo período não ocorrera manifestando-se a rejeição crônica severa (KO et al., 1999)

Por conseguinte, leucócitos passageiros e, em particular, a presença de leucócitos provenientes do doador no receptor, durante os primeiros dias após o transplante, desempenham um papel central no desenvolvimento de aceite de órgão por um longo tempo.

1.3.5-Aspectos funcionais do microquimerismo por um longo período de tempo

Em contraste com os conhecimentos bem estabelecidos sobre os efeitos funcionais dos leucócitos passageiros, no período imediatamente após o transplante, a importância imunológica do microquimerismo por longo período ainda permanece questionável. Quando esse fenômeno foi, pela primeira vez, descrito para alguns pacientes, muitas décadas antes dos transplantes de fígado ou rim, foi sugerido que o microquimerismo estava casualmente relacionado ao aceite do órgão por longo tempo. (STARZL et al., 1992a; STARZL et al., 1993b). Tem sido especulado que sob essas condições, reações imunes bilaterais neutralizariam o enxerto e o receptor. Assim, ocorreria um aceite estável do órgão (STARZL et al., 1998).

A grande maioria dos estudos subseqüentes que analisaram o microquimerismo na prática clínica mais sistematicamente não encontraram, entretanto, correlação entre a detecção e quantificação do microquimerismo específico do doador, e o curso imunológico (rejeição aguda, rejeição crônica) em pacientes após o transplante de rim, coração ou fígado (SCHLITT et al., 1994a; ELWOOD et al., 1997; HISANAGA et al., 1997). Somente alguns estudos propuseram alguma correlação entre o grau de microquimerismo e o curso clínico após o transplante de pulmão. (McSHERRY et al., 1996). Na prática clínica, a incidência total de microquimerismo detectado por PCR ao longo do curso de vários transplantes de órgãos (fígado, pulmão, rim e coração) parece similar em 60 a 80% de todos os pacientes estudados (HISANAGA et al., 1997). A detecção do microquimerismo em pacientes após um longo tempo de transplante, os quais perderam seus enxertos por causas imunológicas, fortemente sugere que, provavelmente, o microquimerismo não é nem a causa, nem o

indicador do aceite do órgão ou de tolerância, mas simplesmente um epifenômeno dos transplantes de órgãos sólidos (SCHLITT et al., 1994b; WOOD et al., 1996).

Contudo, ainda não está claro, se os receptores de transplante diferem nas suas especificidades individuais ou na distribuição específica tecidual das células do doador e, assim, conduzindo a um microquimerismo detectável em pacientes individuais e se tais diferenças podem levar a diferenças no impacto imunológico do microquimerismo.

Com relação a potencial relevância funcional do microquimerismo sistêmico específico de doador, a discussão diz respeito apenas a um número muito pequeno de células específicas do doador presentes na periferia. Ao mesmo tempo, o receptor também tem uma macroquimera devido ao aloenxerto. No interior do órgão, o sistema imune do receptor possui grande potencial para interagir com os antígenos do doador. Como as APCs especializadas são, geralmente, eliminadas após alguns meses, a apresentação do antígeno ocorre na ausência de moléculas coestimulatórias significantes contribuindo para a manutenção da hiporeatividade contra antígenos específicos. Em modelos animais transgênicos, células parenquimais do fígado são particularmente potentes na indução e manutenção da tolerância periférica para antígenos MHC estranhos, expressos exclusivamente no fígado, predominantemente pela eliminação de células T de alta afinidade contra respectivos antígenos (HAMMERLING et al., 1991). Entretanto, aloenxertos transplantados (em particular o fígado) produzem enormes quantidades de antígenos MHC solúveis e que são expelidos para a circulação (McDONALD et al., 1994). Embora essa persistência dos aloantígenos seja crítica para a manutenção da tolerância, a contribuição relevante do microquimerismo em relação ao macroquimerismo local parece ser improvável.

1.3.6-Considerações terapêuticas sobre a indução ativa ou intensificação do microquimerismo alogênico

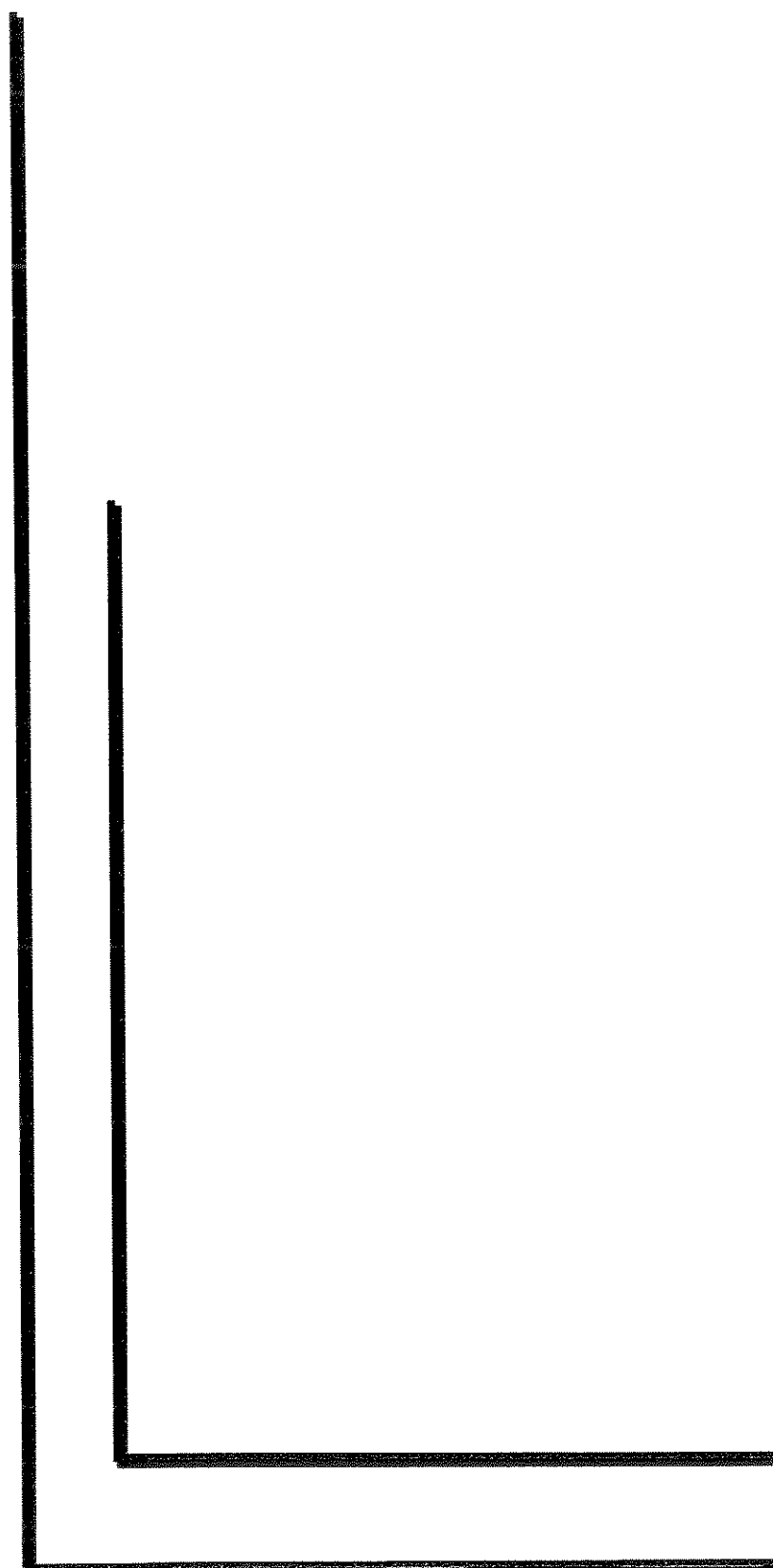
1.3.6.1-Perspectivas imunológicas – dados experimentais

A grande maioria dos dados experimentais está sendo dirigida no tratamento de receptores de enxertos pela indução de diferentes graus de quimerismo, através da infusão de células provenientes do doador, em particular, células hematopoiéticas com o intuito de

induzir uma hiporeatividade específica do doador ou tolerância. Nesse caminho, são basicamente três as formas de tratamento: 1) tratamento com células alogênicas, alguns dias ou semanas anteriores ao transplante, normalmente, com algum tipo de imunossupressão não específica; 2) tratamento com células provenientes de doador no momento, ou um pouco antes do transplante, com ou sem o uso concomitante de medicação imunossupressiva; e 3) estabelecimento do quimerismo hematopoiético estável por transplante de medula óssea, geralmente realizada antes do transplante de órgãos (ROLLES et al., 1994; BARBER et al., 1991; EGUCHI et al., 1996). Com o pré-tratamento, as células alogênicas, sob certas condições, podem causar mudanças persistentes no potencial de aloreatividade do receptor. Assim as células alogênicas podem ter um efeito direto nas respostas do receptor para o órgão transplantado. A aplicação sistêmica de leucócitos de doador imediatamente após o transplante tem mostrado prolongar a sobrevida do enxerto na ausência de qualquer outro imunossupressor (TSUI et al., 2000; YAN et al., 2001). Ao mesmo tempo, alguns estudos sugerem que as células T desempenham o papel mais importante nessa atividade, para a qual tanto a expressão do MHC do doador e algumas reações de DECH parecem também ser necessárias (TSUI et al., 2000). Outros estudos sugerem que as células B desempenham um papel mais importante (YAN et al., 2001). Embora as células do doador infundidas sejam eliminadas do receptor em poucos dias ou semanas, elas parecem ter uma marcante função imunoregulatória que, em certas ocasiões, pode contribuir para a indução da tolerância, provavelmente, por iniciar a anergia e/ou apoptose nas células T aloreativas do receptor. Subseqüentemente, as células T imunoregulatórias do receptor persistem por um longo período (OTA et al., 1997). Uma grande série de experimentos tendo primatas como modelo, usou o macaco Rhesus, onde a medula óssea do doador foi infundida, aproximadamente, duas semanas antes do transplante, seguido de um tratamento imunossupressivo antigamaglobulina timocitário (AGT). Com esse protocolo, uma relevante proporção de animais apresentou uma sobrevida prolongada para aloenxertos MHC incompatíveis (THOMAS et al., 1987). Embora nesses animais um início de microquimerismo tenha sido demonstrado, o papel funcional e as conseqüências imunológicas dessas observações permanecem obscuros. Em contraste, constatou-se que as células imunoregulatórias na medula óssea inoculadas, mais especificamente as células TCD8⁺, CD3, TCR α ou β e MHC classe II, parecem ter um efeito funcional importante

(ASIEDU et al., 1999; GEORGE, et al., 1998). Dessa forma os efeitos observados da infusão de células da medula óssea parecem estar mais relacionados com os mecanismos imunoregulatórios iniciais.

Recentemente, o desenvolvimento de protocolos em modelos de roedores para transplante alogênico de medula óssea sem condicionamento letal e sem o uso de drogas citotóxicas ou irradiação, possibilita considerar tais protocolos na prática clínica (WEKERLE et al., 1999). Dessa forma a tolerância em quimeras completas ou mistas com o transplante de órgãos estável parece ocorrer, predominantemente, devido a deleção de células aloreativas no timo, compreendendo a tolerância central, em contraste com mecanismos de tolerância periférica (TOMITA et al., 1994; KHAN et al., 1996).



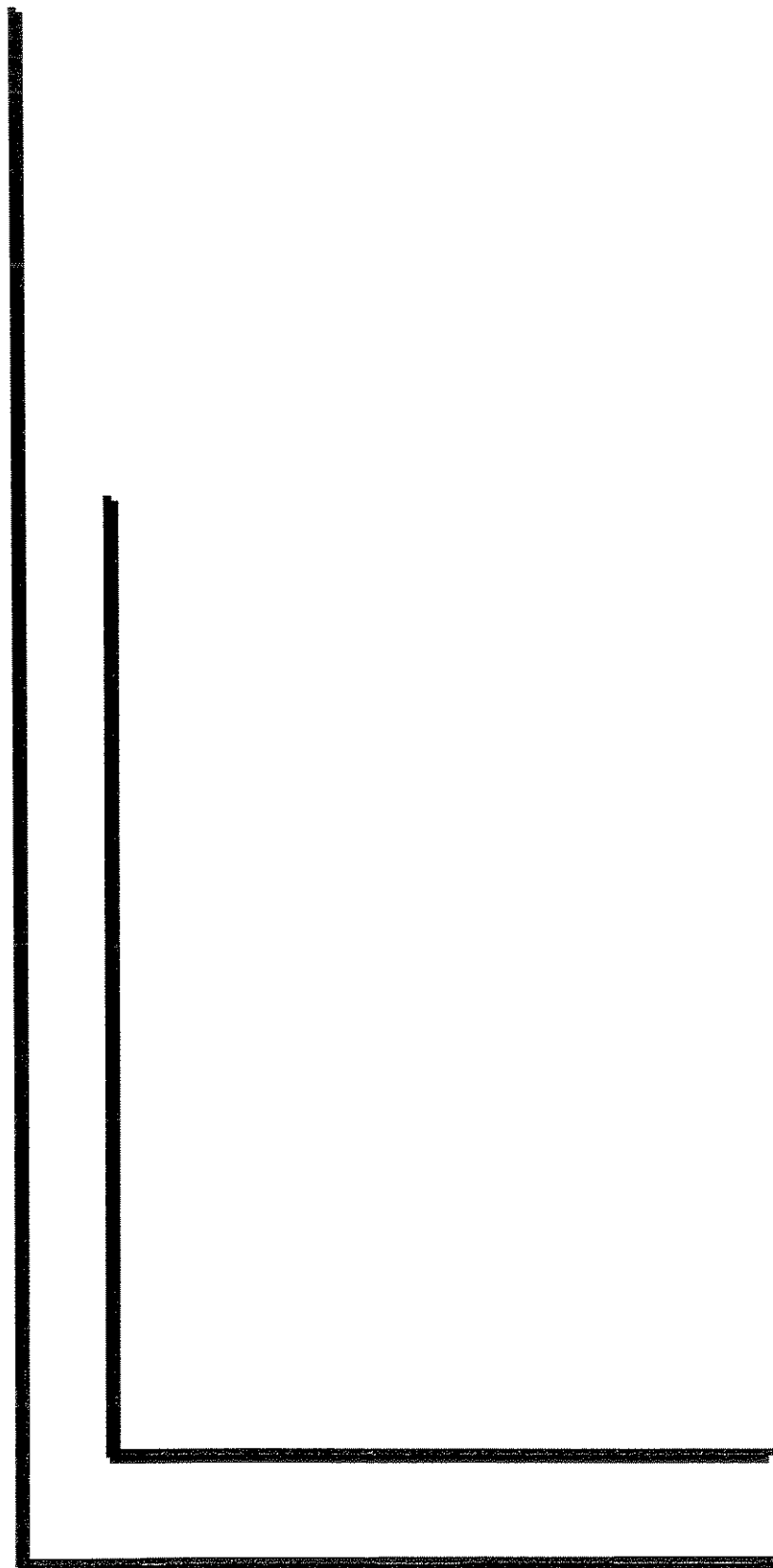
2- OBJETIVOS

Levando em consideração a falta de dados atuais na literatura e a inexistência de trabalhos em pacientes brasileiros, principalmente sobre a importância clínica e imunológica do microquimerismo alogênico, bem como do impacto dos fatores imunogenéticos HLA nas consequências clínicas dos transplantes de fígado, a proposta da presente pesquisa foi:

- Avaliar se o método *nested PCR/SSP* para a detecção dos alelos HLA-DRB1 derivados do doador confirmava a presença do microquimerismo alogênico nos receptores de transplante de fígado;
- Examinar se o polimorfismo dos alelos HLA-DRB1, -DQB1 esteve relacionado com o desenvolvimento de rejeições agudas nos receptores de transplante de fígado;
- Analisar a influência dos anticorpos anti-HLA classe I e classe II, nos resultados, após o transplante de fígado.

Para:

Determinar a importância clínica e imunológica do microquimerismo alogênico em diferentes períodos pós-transplante e do polimorfismo dos alelos HLA de classe II em uma série de 50 pacientes, com a presença, ou ausência, da rejeição e em relação ao tempo de sobrevida, após o transplante de fígado.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1-POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os dados dos 50 pacientes submetidos ao transplante de fígado foram obtidos no ambulatório de Gastro-Cirurgia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

De cada paciente avaliado, na presente pesquisa, foi obtido o consentimento informado e o protocolo de estudo foi devidamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

O grupo de estudo consistiu-se de 32 pacientes homens (64%) e 18 pacientes mulheres (38%), com a idade entre 15 a 65 anos (mediana=50), com as seguintes doenças de base: Cirrose Vírus C (n= 34), Cirrose Vírus B (n=2), Cirrose alcoólica (n=8), Cirrose Criptogênica (n=1), Hepatite Auto-Imune (n= 4) e Síndrome Budd-Chiari (n=1). A tabela 1 mostra as características dos 50 pacientes estudados após o transplante de fígado, de acordo com idade, sexo e diagnóstico pré-transplante.

No grupo-controle foram usados 100 indivíduos sadios não relacionados com o mesmo grupo étnico.

Tabela 1-Características dos 50 pacientes estudados no pré-transplante de fígado

<i>Pacientes</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Diagnóstico Pré-transplante</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Diagnóstico Pré-transplante</i>
1. VAG	30	M	Cirrose alcoólica	26. JRC	52	M	Cirrose Vírus C
2. JRP	41	M	Cirrose Vírus C	27. FC	63	M	Cirrose alcoólica
3. ELJ	15	M	Hepatite Auto- Imune	28. FAG	55	M	Cirrose Criptogênica
4. JRJ	37	M	Cirrose alcoólica	29. ADCF	50	F	Cirrose Vírus C
5. JL	42	M	Cirrose Vírus C	30. MBR	55	F	Cirrose Vírus C
6. HCS	65	M	Cirrose Vírus C	31. AVG	44	M	Cirrose Vírus C
7. LB	50	M	Cirrose Vírus C	32. GOP	52	F	Cirrose Vírus C
8. TMAM	62	F	Cirrose Vírus C	33. TC	54	F	Cirrose Vírus C
9. GAF	58	F	Cirrose Vírus C	34. SOP	29	F	Cirrose Vírus C
10. N A M	62	M	Cirrose Vírus C	35. RSSS	20	F	Budd-Chiari
11. A C	34	M	Cirrose Vírus C	36. JA	54	M	Cirrose Vírus C
12. SF	47	M	Cirrose alcoólica	37. OAF	50	M	Cirrose Vírus C
13. PA B	53	M	Cirrose alcoólica	38. MAL	51	F	Cirrose Vírus C
14. LST	43	M	Cirrose Vírus C	39. SMMY	41	F	Cirrose Vírus C
15. MAAC	56	F	Cirrose Vírus C	40. MCA	42	F	Cirrose Vírus C
16. AC	16	F	Hepatite Auto- Imune	41. ASBF	59	M	Cirrose Alcoólica
17. PCG	50	M	Cirrose Vírus C	42. DDFP	57	M	Cirrose Vírus C
18. CF	54	M	Cirrose Vírus C	43. DS	60	M	Cirrose Vírus B
19. AZ	50	M	Cirrose Vírus C	44. MLG	58	M	Cirrose Vírus C
20. NR	52	F	Cirrose Vírus C	45. JB	55	M	Cirrose Vírus B
21. VC	55	M	Cirrose alcoólica	46. VPM	45	M	Cirrose Vírus C
22. LLL	59	F	Cirrose Vírus C	47. MCZ	29	F	Cirrose Vírus C
23. JB	67	M	Cirrose alcoólica	48. JCJN	27	M	Cirrose Vírus C
24. MAV	17	M	Hepatite Auto- Imune	49. ARC	49	M	Cirrose Vírus C
25. JB	17	F	Hepatite Auto- Imune	50. VLCP	45	F	Cirrose Vírus C

3.2-TIPAGEM DOS GENES HLA DE CLASSE II –DRB1 E –DQB1

Amostras de sangue periférico eram obtidas dos pacientes no pré e pós- transplante de fígado, a partir de 10 dias até 16 meses, e as amostras dos 50 doadores foram obtidas de células de gânglios ou de baço.

Caracterização do ensaio

A tipagem dos genes HLA-DRB1 e -DQB1 foi realizada no receptor pré-transplante de fígado e seu respectivo doador. A extração e purificação do DNA foram realizadas, através do método “Salting Out”, introduzido, inicialmente, por MULLER et al., 1988, a partir de células do sangue periférico. O DNA foi amplificado pela reação da polimerase em cadeia, com um conjunto de “primers” sequência específica, segundo a metodologia desenvolvida por Olerup & Zetterquist, 1992, utilizando-se microplacas, com 32 poços contendo os “primers” nível I – genérico, fornecidas pela one Lambda, INC-CA EUA.

3.2.1-Extração e purificação do DNA

Foram colhidos 10 ml de sangue venoso do paciente em tubos de 5 ml contendo EDTA como anticoagulante. O sangue total foi transferido para um tubo cônico de polipropileno estéril de 50ml. Foram adicionados 40 ml de foi homogeneizada por inversão e centrifugada durante 5 minutos a 2400 x g (3200 rpm) a + 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o precipitado ressuspensionado em 4,5 ml do tampão de lise II para lisar os glóbulos brancos, agitado vigorosamente por 10 segundos a temperatura ambiente. Para a extração de proteínas foram adicionados 2 ml de NACL 6M e agitado vigorosamente durante 15 segundos em temperatura ambiente. Após uma segunda centrifugação a 1500 x g (2600 rpm) por 5 minutos, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 50 ml e foi adicionado 7ml de isopropanol absoluto, homogeneizado cuidadosa e lentamente para a precipitação e ressuspensão do DNA. O DNA precipitado foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e lavado três vezes em 3ml de álcool etílico a 70%, por 1 minuto, em temperatura ambiente e redissolvido em 300 a 500µl de água deionizada estéril. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro, em 260nm e 280nm (UV) e o grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre absorbância obtida em 260nm e 280nm (A260:A280). Essa razão foi considerada adequada quando permaneceu entre 1,6 a 2,0. Finalmente, a concentração do DNA foi ajustada para 100 ng/µl, com água deionizada estéril. Posteriormente, foi

realizada a amplificação do DNA e a amostra concentrada foi armazenada em freezer a -20°C.

Foram utilizados gânglios linfáticos ou baços extraídos do doador e foram acondicionados em meio RPMI-1640 ou em Hanks com 10% de soro bovino fetal (S.B.F). Em seguida, foi realizada a extração das células, injetando-se o meio de Hanks em uma das extremidades do gânglio ou baço. Esse material foi recolhido, centrifugado, lavado e ressuspensionado em Hanks, e foi realizada a extração de DNA.

3.2.2-Amplificação do gene HLA-DRB1 e -DQB1 utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR), com primers de sequência específica (SSP)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível para separar grandes quantidades de genes HLA específicos para tipagem HLA. Utilizando esse método, pode-se gerar milhões de cópias de um gene específico (HURLEY et al.,1997).

A reação de amplificação em nível I (genérico) foi realizada em microplacas com 32 poços contendo os “primers” já padronizados. Os demais reagentes da reação de amplificação foram misturados em um tubo (mix) - as bases nitrogenadas, MgCl₂, corante vermelho cresol e 2µl da enzima Taq polimerase-(5U/µl). Inicialmente, foram retirados 9µl da solução (mix) e adicionados na escavação do controle negativo, previamente preparada com 1µl de água deionizada estéril; a seguir foi adicionada ao restante da solução (mix) 39 µl de DNA. E por fim, foi colocado 10 µl da solução (mix) em cada um dos poços da placa, exceto no controle negativo.

Pelo método PCR/SSP, foram realizadas as identificações, em nível genérico, do alelo HLA-DRB1, através de 13 reações para as especificidades HLA-DRB1, 3 reações para as especificidades HLA-DRB3, 1 reação para o alelo DRB4, 2 reações para o alelo DRB5 e 5 reações para as especificidades HLA-DQB1.

Para a amplificação do DNA, a microplaca foi colocada em um termociclador, com 30 ciclos de, aproximadamente, 1 hora e 20 minutos, com as temperaturas indicadas a seguir: 94°C por 2 minutos, para a desnaturação; 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 94°C por 10 segundos, para a desnaturação; 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 8

vezes 94°C por 10 segundos, para a desnaturação e 8 vezes 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 94°C por 10 segundos, para a desnaturação; 55°C por 50 segundos, para o anelamento; 72 °C por 30 segundos, para a extensão; 19 vezes 94°C por 10 segundos, 19 vezes 72°C por 30 segundos; e 4°C até 24 horas, para refrigeração.

No final dos ciclos, os primers foram aplicados no gel de agarose a 2% com a adição do brometo de etídio a 0,5%.

3.2.3-Análise do DNA amplificado

Para determinar se o DNA foi bem amplificado após a reação de PCR, os produtos de amplificação da reação em cadeia da polimerase foram separados por eletroforese em gel. A preparação do gel foi realizada utilizando-se agarose a 2% em Tampão Tris-Borato. A agarose foi dissolvida a alta temperatura, entre 90°C e 95°C, em um aparelho de microondas por 2 a 3 minutos, resfriado até 60°C com posterior adição de brometo de etídio a 0,5%, homogeneizada e despejada na placa com pentes de 1 mm, para a formação de poços, e permanecendo em repouso por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após a retirada dos pentes, o gel foi colocado na cuba de eletroforese, com o nível da solução tampão (Triz-Borato-1X) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel. Foram, então, aplicados os produtos de amplificação padronizados e o controle negativo. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 220V. Após esse período, o gel foi colocado em um transiluminador UV (312nm) e fotografado para posterior documentação e interpretação.

3.2.4-Fotodocumentação e interpretação dos resultados da tipagem por DNA

A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do próprio alelo ou grupo específico; em cada uma das misturas de iniciadores específicos, contém, também, um par de iniciadores não-alélicos que amplificava o gene da β globina humana, servindo como controle positivo de amplificação. Esse conjunto de “primers” não-alélicos era 5 vezes mais concentrado que os “primers” específicos, produzindo um produto de amplificação de 750 pares de bases, sendo visualizadas quando a amplificação grupo-específico não ocorria. A presença de amplificação grupo específico foi visualizada no gel

pela formação de um produto de cerca de 125 a 250 pares de bases. No poço referente ao controle negativo, nenhum desses fragmentos foi observado.

3.2.5-Associação e definição dos alelos HLA de tipagem por DNA

As tipagens HLA foram determinadas pela comparação dos primers positivos e negativos, utilizando a lista de alelos conhecidos. Os resultados de fotodocumentação foram inseridos em uma planilha, fornecida pela One lamda – Inc – Ca – EUA, onde estavam definidas as mesmas especificidades contendo “primers”. Através de programa de computador, Software, também fornecido pela One Lamda – Inc – Ca – EUA, foi possível realizar a interpretação a fim de definir com exatidão o/os alelos dos pacientes em estudo.

3.3-TIPAGEM POR *NESTED* PCR/SSP PARA DETECÇÃO DO MICROQUIMERISMO

Características do ensaio

A metodologia da *nested* PCR/SSP foi utilizada para detecção do microquimerismo, ou seja, alelos do doador encontrados na circulação do receptor. Foi modificada por BEIN et al., 1992, e realizada com o DNA genômico do receptor após transplante hepático. A *nested* PCR-SSP consiste em dois ensaios consecutivos de PCR, sendo que, o primeiro PCR é a amplificação genérica com primers, amplificando uma região de 274-bp do exon 2 do gene DRB1, localizado no braço curto do cromossomo 6, e o segundo PCR é a amplificação do produto do primeiro PCR com primers específicos dos alelos do doador. Para o controle negativo, foi utilizado DNA do paciente no pré-transplante.

3.3.1-Amplificação da primeira etapa da *nested* PCR/SSP

A primeira etapa de amplificação do exon 2 do gene HLA-DRB foi realizada em um volume total de 50 µl contendo: 5,0 µl de DNA genômico (0,5 µg/µl), 27.8 µl de água deionizada e autoclavada, 5,0 µl de tampão de PCR (10x50 nM), 1,5 µl de MgCl(50 nM), 1,3 µl de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (10mM), 2,5 µl de primer-5' (10pm/µl),

2,5 µl de primer-3' (10pm/µl) e por fim, a Taq polimerase 0,5 µl (5U/µl). Essa solução foi preparada em banho de gelo, homogeneizada com a pipeta automática e colocada no termociclador. Para o controle negativo, foi adicionado 5,0 µl de água deionizada ou Tampão Borato (TB).

3.3.2-Condições de amplificação para a *nested PCR/SSP*

A amplificação da PCR foi realizada no termociclador da Perkin-Elmer-Gene Amp-PCR System 9800, utilizando-se do seguinte programa para amplificação: consiste de uma desnaturação inicial a 95°C, por 4 min, seguida por 30 ciclos a 95°C, por 1 min, para a desnaturação; 53°C, por 1 min, para anelamento e 72°C, por 45 Seg, para a extensão. Após a amplificação, os produtos da reação de polimerização em cadeia foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato, contendo brometo de etídeo. Após esse período, o gel foi colocado em um transiluminador UV (312 nm) e fotografado para documentação e interpretação. A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do alelo.

3.3.3-Preparação da segunda etapa da *nested PCR/SSP*

Após confirmação da presença do produto da PCR genérica pela eletroforese em gel de agarose, o produto do primeiro PCR foi diluído 1:100 e, então, submetido a uma nova amplificação, usando-se primer específico para o alelo HLA-DRB1 do doador. Foi utilizado 5,0 µl de DNA genômico diluído, 27.8 µl de água deionizada e autoclavada, 5,0 µl de tampão de PCR (10x50 nM), 1,5 µl de MgCL(50 nM), 1,3 µl de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (10mM), 2,5 µl de primer específico (10 pm/µl), 2,5 µl de primer-3' (10pm/ µl) e, por fim, a Taq polimerase 0,5 µl (5U/µl). Essa solução foi preparada em banho de gelo, homogeneizada e colocada no termociclador, utilizando-se o seguinte programa para amplificação: 94°C, por 4 min para a desnaturação inicial, seguida por 30 ciclos a 94°C, por 20 seg, para a desnaturação; 60°C, por 20 seg, para anelamento e 72°C, por 450 seg, para a extensão. Após a amplificação, os produtos da reação de polimerização em cadeia foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato, contendo brometo de etídeo. Após esse período, o gel e foi colocado em um

transiluminador UV (312 nm) e fotografado para posterior documentação e interpretação. A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do alelo.

3.4-REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA UM PAINEL DE CÉLULAS T CLASSE I E CÉLULAS B CLASSE II, UTILIZANDO-SE A CITOTOXICIDADE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO (CDC)

Na pesquisa da porcentagem de anticorpos reativos em painel de células T e B, foram utilizadas as técnicas clássicas de microlinfocitotoxicidade Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC) (TERASAKI & McCLELLAND, 1964; TERASAKI, et al., 1974 e adaptadas segundo HOPKINS, 1990), onde foi determinada a presença de anticorpos em receptor pré e pós-transplante, contra os antígenos de um painel de células conhecidas. Foram selecionadas trinta células T e vinte células B, frescas ou congeladas em nitrogênio líquido. Essas células foram previamente tipificadas na rotina laboratorial e incluíam todos os antígenos de histocompatibilidade presentes na nossa população de Campinas (THOMAZ et al., 1998)

Foram preparadas placas contendo soros dos pacientes em pré e pós-transplante, todos os soros foram tratados com DTT para inativação de anticorpos IGM e foram utilizados nas seguintes diluições: puro, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 e distribuídos nos diferentes poços das placas de Terasaki. As células T foram adicionadas nas placas previamente preparadas com os soros dos pacientes e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 5µl de complemento e, novamente, incubadas por 60 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para as células B, apenas modificando o tempo de incubação de 60 minutos com as células e 120 minutos com o complemento.

Posteriormente, foi adicionado o corante eosina y e incubado por mais 5 minutos e, em seguida, foi adicionado o formaldeído por 5 minutos e as placas foram armazenadas em geladeira. Após 12 horas, foi feita a leitura em microscópio de fase invertida e o resultado foi avaliado através da porcentagem de lise e as reações positivas indicavam anticorpos presentes no soro do receptor, posteriormente foi calculada a porcentagem de reatividade para cada soro com relação às especificidades antigênicas

testadas. A reação foi considerada positiva, quando a reatividade frente aos alelos testados era superior a 10%.

3.5-DIAGNÓSTICO DE REJEIÇÃO AGUDA

Os pacientes estudados ao apresentarem suspeita clínica de rejeição foram submetidos à biópsias hepáticas percutâneas guiadas por ultra-som. A principal indicação clínica da biópsia foi o aumento de transaminases e/ou icterícia.

Os fragmentos de fígado foram fixados em formol a 10% durante, pelo menos, 12 horas. Após fixação, os fragmentos foram incluídos em parafina e, então, cortados com espessura de 6 micrômetros. Utilizou-se, para avaliação histológica dos fragmentos, as colorações de hematoxilina-eosina (HE), tricrômio de Masson, azul da Prússia (Perls) e reticulina.

No exame microscópico, foram avaliados os critérios histológicos de rejeição celular aguda:

- a) Infiltrado inflamatório de células redondas;
- b) Outras células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos);
- c) Endotelite (endovascularite);
- d) Agressão de células especializadas por linfócitos T citotóxicos ativados;

A graduação da rejeição celular aguda nos pacientes estudados foi feita de acordo com o Índice de Atividade de Rejeição (Consenso Internacional de Banff, 1997), através do qual é calculado um escore (0 até 9):

0 - 3 = rejeição celular aguda leve;

4 ≤ 6 = rejeição celular aguda moderada;

7 ≤ 9 = rejeição celular aguda intensa.

3.6 -ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada utilizando teste não paramétricos, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Os seguintes testes foram aplicados:

- 1) Teste exato de Fisher ou qui-quadrado (SVEJGAARD et al., 1986) para comparação das variáveis imunogenéticas entre os grupos microquimerismo versus rejeição, microquimerismo versus desigualdades, desigualdades versus rejeição, entre as frequências alélicas do grupo de pacientes e do grupo controle e para a reatividade de anticorpos anti-HLA classe I e classe II . A significância estatística foi dada quando $p < 0,05$.
- 2) Teste de Kaplan-Meier (NEUMANN et al., 2003) com comparação Log Rank entre as curvas de sobrevida para os 50 pacientes estudados versus microquimerismo, desigualdades HLA-DRB1, alelo HLA-DRB1*15011 e sexo.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade.

4- RESULTADOS

4.1-TIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1

Os alelos HLA-DRB1 e -DQB1 dos pares receptores e doadores foram tipificados e diferenciados antes do transplante em nível de resolução intermediária, utilizando as reações de cadeia da polimerase e primers de sequência específica, usando uma só PCR/SSP de acordo com o método de Ollerup e Zetterquist, 1992 (tabela 2).

4.2-ANÁLISE DO MICROQUIMERISMO DE ALELOS HLA-DRB1 POR *NESTED PCR-SSP*

Na detecção do microquimerismo, foi empregada a técnica de *nested PCR-SSP* modificada do método de Bein e colaboradores, 1992. A *nested PCR-SSP* foi realizada a partir do DNA do receptor, após o transplante de fígado. A sequência de DNA a ser amplificada foi definida pelos “primers”, consistindo-se de pequenos segmentos de DNA, permitindo o anelamento da fita simples de DNA e síntese pela enzima polimerase, da segunda fita. A *nested PCR-SSP* consistiu em dois ensaios consecutivos de PCR, sendo que a primeira PCR amplificou a região do exon 2 do gene DRB1, utilizando-se os “primers” DRB-AMPA (DRB genérico 5’): 6C-CCC-ACA-gCA-CgT-TTC-TTg; e DRB-AMPB (DRB genérico 3’): CCgg-CTg- CAC-TgT-gAA-gCT-CT, que flanqueou a região a ser amplificada. Utilizou-se o produto dessa 1ª PCR para realização da 2ª PCR, onde utilizou-se primers específicos do doador. Com a 2ª PCR, foi possível obter uma melhor amplificação do fragmento que continha a região alvo. Para a realização dessa 2ª PCR, foi selecionado, previamente, um painel de primer específico dos alelos do doador, os quais incluíram: DRB1*01, DRB1*15, DRB1*16, DRB1*17, DRB1*18, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 e DRB1*14, utilizados na reação de *nested PCR-SSP*.

A análise dos produtos das reações de amplificação por *nested PCR-SSP* para detectar o microquimerismo foi analisada em gel de agarose. A figura 1 mostra uma interpretação da tipagem por *nested PCR-SSP*, realizada em 6 pacientes dos 50 estudados, onde foram identificados os alelos do doador presentes no receptor, através de bandas.

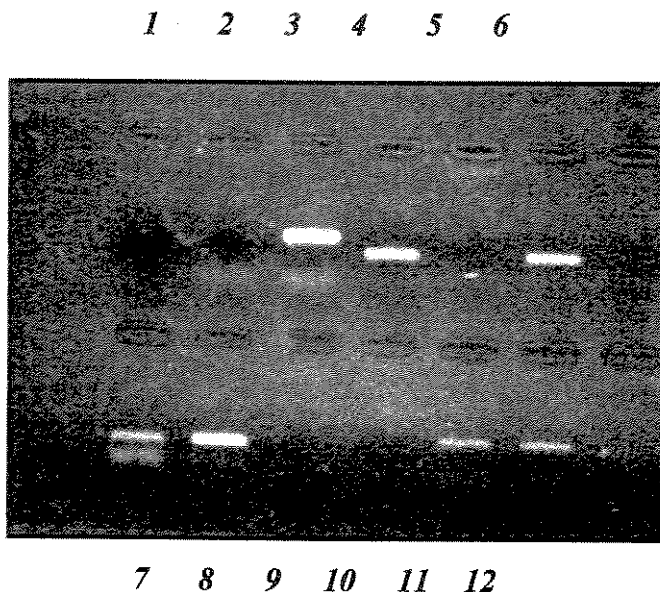


Figura 1-Análise em gel de agarose dos produtos das reações de amplificação por *nested PCR-SSP*.

As posições das bandas na horizontal indicam os controles negativos e as detecções dos alelos do doador:

- Posições 1 e 2, mostram os controles negativos (amostras de DNA de pacientes pré-transplantes);
- Posições 3 e 4, paciente 1: mostram a detecção do DRB1*03,*11 (doador) no receptor de fígado DRB1*01,*07;
- Posição 5, paciente 2: não foram detectados alelos do doador no receptor;
- Posições 6 e 7, paciente 3: foram detectados os alelos DRB1*04,*16 (doador) no receptor DRB1* 03,*13;
- Posição 8, paciente 3: foi detectado o alelo DRB1*04, (doador) no receptor DRB1* 15,*16;
- Posições 9 e 10, paciente 4: não foram detectados os alelos do doador no receptor;
- Posições 11 e 12, paciente 6: foi detectado o alelo DRB1*08 do doador no receptor DRB1*11, *16.

As tabelas 2 e 3, a seguir, mostram os resultados obtidos da tipagem HLA-DRB1 e *nested PCR/SSP* dos pares receptores e doadores nos 50 pacientes estudados. Na tabela 2, encontram-se os resultados da tipagem dos alelos HLA-DRB1 dos pares receptores e doadores, o número de desigualdades HLA-DRB1 e a detecção das especificidades do doador (presença, ou ausência, do DNA genômico competidor). A tabela 3 indica a correlação entre a presença ou ausência de microquimerismo de 10 dias a 16 meses após o transplante de fígado, o número de desigualdades e os episódios de rejeição em 50 receptores.

Tabela 2-Análise de alelos HLA-DRB1 nos pares receptores e doadores, e detecção de microquimerismo alogênico em 50 pacientes, após o transplante de fígado.

<i>Pacientes</i>	<i>Alelos HLA-DRB1</i>		<i>Desigualdades HLA-DRB1</i>	<i>Microquimerismo Alogênico</i>	
	<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>		<i>Um Alelo HLA-DRB1</i>	<i>Dois Alelos HLA-DRB1</i>
1. VAG	*01,*07	*03,*11	2	*03	*11
2. JRP	*07	*04,*14	2	*04	*14
3. ELJ	*13	*04,*08	2	ND	ND
4. JRJ	*03	*01,*13	2	*01	*13
5. JL	*15,*03	*01,*03	1	*01	-
6. HCS	*15,*16	*04,*15	1	*04	-
7. LB	*03,*13	*04,*16	2	*04	*16
8. TMAM	*07,*11	*11,*15	1	*15	-
9. GAF	*13,*15	*08,*14	2	ND	ND
10. NAM	*04	*03,*07	2	ND	ND
11. AC	*12,*15	*07,*15	1	ND	ND
12. SF	*15,*03	*07,*15	1	*07	-
13. PAB	*13,*14	*01,*03	2	*01	*03
14. LST	*11	*11,*08	1	*08	-
15. MAAC	*07,*15	*07,*08	1	*08	-
16. AC	*03,*08	*16,*08	1	*16	-
17. PCG	*11,*16	*03,*16	1	*03	-
18. CF	*13,*10	*03,*10	1	*03	-
19. AZ	*04,*11	*07	1	*07	-
20. NR	*03,*14	*03,*11	1	*11	-

<i>Pacientes</i>	<i>Alelos HLA-DRB1</i>		<i>Desigualdades HLA-DRB1</i>	<i>Microquimerismo Alogênico</i>	
	<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>		<i>Um Alelo HLA-DRB1</i>	<i>Dois Alelos HLA-DRB1</i>
21. VC	*04*08	*07,*08	1	*07	-
22. LLL	*07	*03,*15	2	*03	*15
23. JB	*13,*10	*03,*10	1	*03	-
24. MAV	*07,*13	*01	1	*01	-
25. JB	*07,*12	*11,*12	1	ND	-
26. JRC	*08,*14	*13,*14	1	*13	-
27. FC	*07,*16	*07,*13	1	ND	-
28. FAG	*07	*01,*15	2	ND	*15
29. ADCF	*11	*01,*13	2	ND	ND
30. MBR	*04,*15	*11,*15	1	*11	-
31. AVG	*07,*11	*11,*13	1	ND	-
32. GOP	*10,*15	*11,*13	2	*11	*13
33. TC	*08,*16	*07,*15	2	*07	*15
34. SOP	*07	*07,*11	1	ND	-
35. RSSS	*08,*09	*01,*07	2	*01	*07
36. JA	*13,*07	*01,*11	2	ND	ND
37. OAF	*03,*11	*08,*13	2	ND	ND
38. MAL	*03,*04	*01,*13	2	*01	*13
39. SMMY	*04,*13	*11,*13	1	*11	-
40. MCA	*03,*07	*11,*13	2	*11	*13
41. ASBF	*07,*13	*04,*11	2	*04	ND
42. DDFP	*04,*15	*13,*14	2	*13	*14
43. DS	*03,*15	*15,*16	1	*16	-
44. MLG	*03,*07	*03,*10	1	ND	-
45. JB	*11,*16	*08,*11	1	*08	-
46. VPM	*04,*07	*13,*15	2	*13	*15
47. MCZ	*04,*13	*03,*13	1	*03	-
48. JCJN	*03,*11	*01,*08	2	*01	*08
49. ARC	*12,*07	*03,*11	2	*03	*11
50. VLCP	*03	*01,*03	1	ND	-

ND= Não detectado

Tabela 3-Correlação entre a presença, ou ausência, de microquimerismo de 10 dias a 16 meses, após o transplante de fígado, e os episódios de rejeição em 50 receptores.

<i>Pacientes</i>	<i>Tempo pós-transplante</i>		Microqui- Merismo	Desigualdades HLA-DRB1	Episódios de Rejeição
	<i>dias</i>	<i>meses</i>			
1. VAG	-	16	+	2	0
2. JRP	-	5	+	2	2
3. ELJ	-	5 e 12	-	2	0
4. JRJ	-	2	+	2	0
5. JL	-	5	+	1	0
6. HCS	-	1 e 3	+	1	0
7. LB	-	1 e 3	+	2	0
8. TMAM	-	4	+	1	1
9. GAF	10	-	-	2	1
10. NAM	-	1 e 3	-	2	1
11. AC	21	-	-	1	1
12. SF	-	1 e 4	+	1	0
13. PAB	-	9	+	2	0
14. LST	-	12	+	1	2
15. MAAC	21	-	+	1	0
16. AC	21	-	+	1	1
17. PCG	-	1	+	1	0
18. CF	-	3 e 6	+	1	0
19. AZ	-	2	+	1	0
20. NR	-	6	+	1	1
21. VC	-	7	+	1	0
22. LLL	-	3	+	2	0
23. JB	-	2	+	1	1
24. MAV	-	3	+	1	1
25. JB	12	-	-	1	1
26. JRC	-	2	-	1	0
27. FC	-	3	-	1	1
28. FAG	-	3	+	2	0
29. ADCF	-	3	-	2	1
30. MBR	10	-	+	1	0
31. AVG	-	3	-	1	3
32. GOP	-	3	+	2	0
33. TC	-	3 e 6	+	2	1
34. SOP	-	3	-	1	0
35. RSSS	10	-	+	2	0

<i>Pacientes</i>	<i>Tempo pós-transplante</i>		Microqui- Merismo	Desigualdades HLA-DRB1	Episódios de Rejeição
	<i>dias</i>	<i>meses</i>			
36. JA	-	3	-	2	2
37. OAF	-	1	-	2	0
38. MAL	-	3	+	2	1
39. SMMY	-	3 e 7	+	1	0
40. MCA	-	3	+	2	0
41. ASBF	-	3	+	2	0
42. DDFP	-	1	+	2	0
43. DS	-	1	+	1	0
44. MLG	-	1	-	1	1
45. JB	10	-	+	1	1
46. VPM	10	-	+	2	0
47. MCZ	10	-	+	1	0
48. JCJN	10	-	+	2	0
49. ARC	10	-	+	2	0
50. VLCP	-	1	-	1	0

4.3-MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO APÓS TRANSPLANTE DE FÍGADO

Para a análise das amostras clínicas foi utilizado a *nested PCR/SSP* (figura 2). O microquimerismo, após o transplante de fígado, foi detectado em 36 pacientes (72%), conforme mostra a tabela 4. Nos 23 pacientes com duas desigualdades HLA-DRB1, 17 pacientes (74%) apresentaram microquimerismo positivo e, desses, 15 pacientes receberam dois alelos HLA-DRB1 do doador e 2 pacientes receberam um alelo do doador. Nos 27 pacientes que receberam uma desigualdade, o microquimerismo foi observado em 19 pacientes (70%).

Tabela 4-Desigualdades HLA-DRB1 e detecção do microquimerismo alogênico

<i>Desigualdades^a HLA-DRB1</i>	<i>Pacientes (n=50)</i>	Microquimerismo Alogênico		
		<i>Um Alelo HLA-DRB1</i>	<i>Dois Alelos HLA-DRB1</i>	<i>%^b</i>
Uma	27	19	NA ^c	70%
Duas	23	02	15	74%

^a Para cada combinação de desigualdades HLA-DRB1 observada, o número de pacientes é dado em relação ao número de especificidades HLA-DRB1 derivado do doador.

^b Total de porcentagem de receptores quiméricos para uma e duas desigualdades HLA-DRB1.

^c NA, não aplicável

4.4-ANÁLISE DO MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO NO SANGUE PERIFÉRICO DE RECEPTORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Na detecção do microquimerismo, foram utilizadas amostras de DNA genômico dos pacientes após o transplante de fígado, a partir de 10 a 480 dias e identificando o número dos pacientes pesquisados quanto à presença e ausência do microquimerismo. A maioria do microquimerismo foi pesquisada com 30 e 90 dias após o transplante de fígado, conforme mostra a figura 2. Alguns desses pacientes foram pesquisados em duas fases e, em todas, o microquimerismo foi detectado.

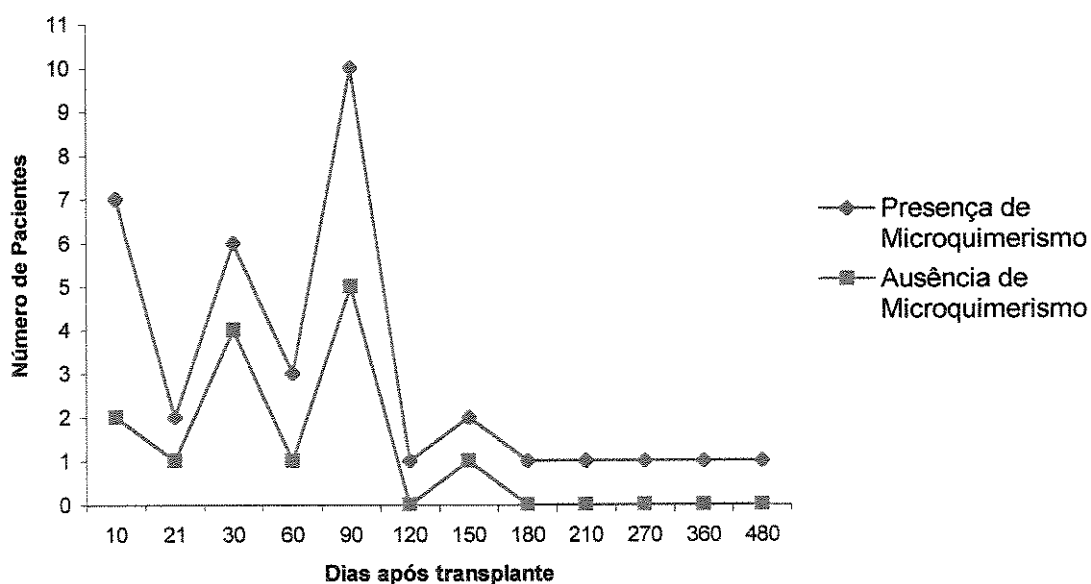


Figura 2- Presença e ausência de microquimerismo durante um período de 10 dias a 480 dias (16 meses) nos 50 pacientes, após transplante de fígado.

4.5-AVALIAÇÃO DO MICROQUIMERISMO ALOGÊNICO NOS 50 PACIENTES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Nas combinações dos pares doadores e receptores, entre os 50 pacientes estudados, após o transplante de fígado, foi detectada a presença do microquimerismo em 36 pacientes (72%), que apresentaram pelo menos uma incompatibilidade HLA-DRB1. Nos

demais 14 pacientes (28%) não houve presença de microquimerismo, conforme ilustra a figura 3.

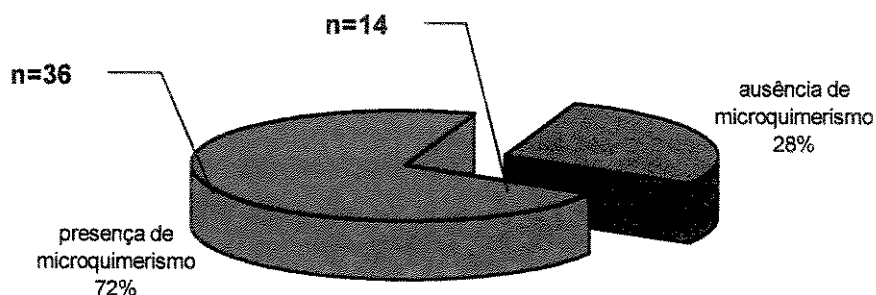


Figura 3-Presença do microquimerismo alôgênico nos 50 pacientes estudados

4.6-PRESENÇA DO MICROQUIMERISMO E REJEIÇÃO EM RECEPTORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Quando associado o microquimerismo com a rejeição, dos 36 pacientes (72%) com microquimerismo, apenas 10 pacientes (28%) apresentaram rejeição e 26 pacientes (72%) não apresentaram rejeição. Dos 14 pacientes sem microquimerismo, 9 deles (64%) apresentaram rejeição e 5 pacientes (36%) não apresentaram rejeição, conforme mostra a figura 4.

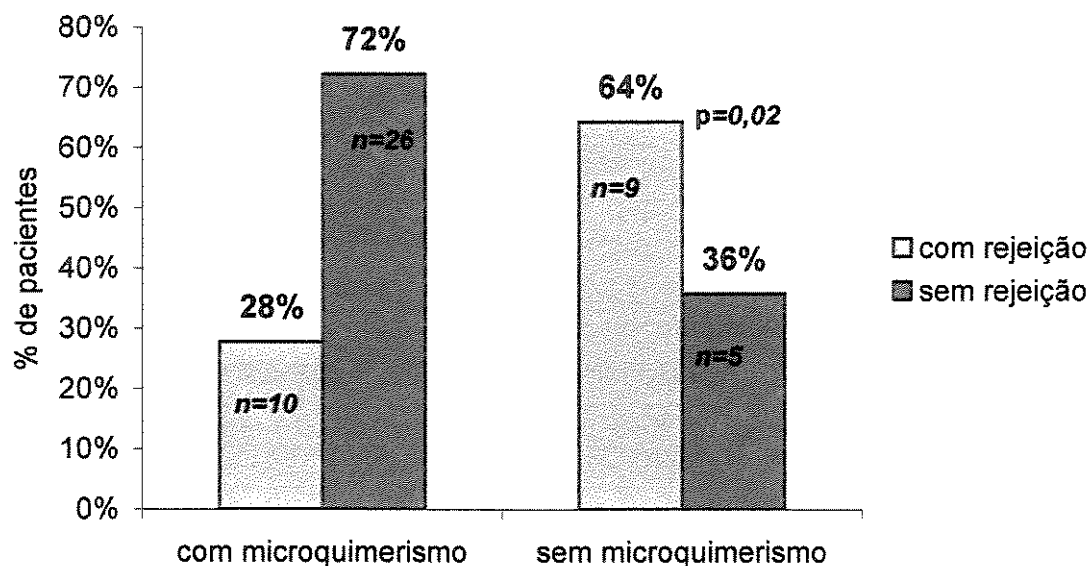


Figura 4-Presença do microquimerismo e rejeição. O valor de $p<0,02$ pelo teste exato de Fischer foi estatisticamente significativo entre o grupo de pacientes com microquimerismo sem rejeição versus não-rejeição.

4.7-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES EM RELAÇÃO AO MICROQUIMERISMO, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

A análise do tempo de sobrevida dos pacientes, com relação ao microquimerismo, mostrou que o tempo de sobrevida é semelhante nos pacientes, tanto na presença, quanto na ausência de microquimerismo, conforme mostra a figura 5.

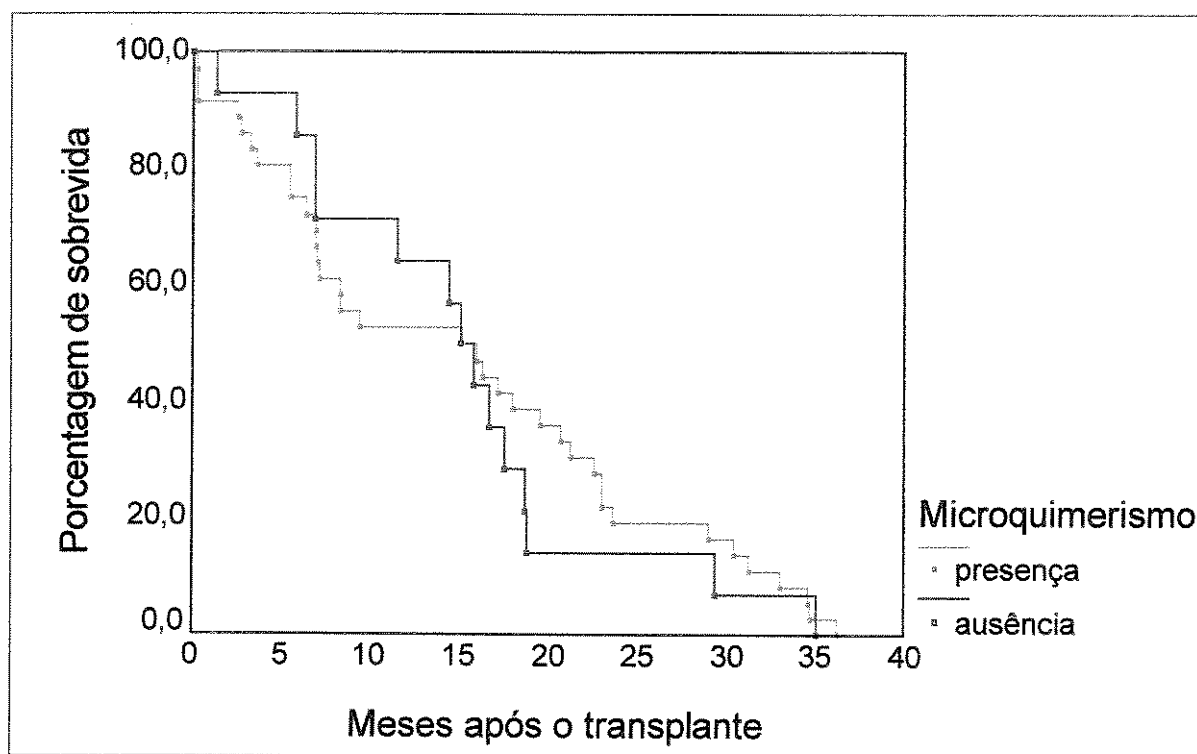


Figura 5-Presença do microquimerismo alógeno e tempo de sobrevivência. A comparação por Log Rank não mostrou diferença significativa ($p=0,71$) entre o grupo de pacientes com presença ou ausência do microquimerismo, quando se correlacionou com o tempo de sobrevivência dos pacientes, após o transplante de fígado.

4.8-PRESENÇA DO MICROQUIMERISMO E DESIGUALDADES HLA-DRB1 DOS PARES RECEPTORES/DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

A associação do microquimerismo e desigualdades HLA-DRB1 dos pares receptores/doadores mostrou que dos 36 pacientes com microquimerismo, 19 dos pacientes (53%) receberam uma desigualdade e 17 pacientes (47%) receberam duas desigualdades e, dos 14 pacientes que não apresentaram microquimerismo, 8 pacientes (57%) receberam uma desigualdade e 6 pacientes (43%) receberam duas desigualdades, conforme mostra a figura 6.

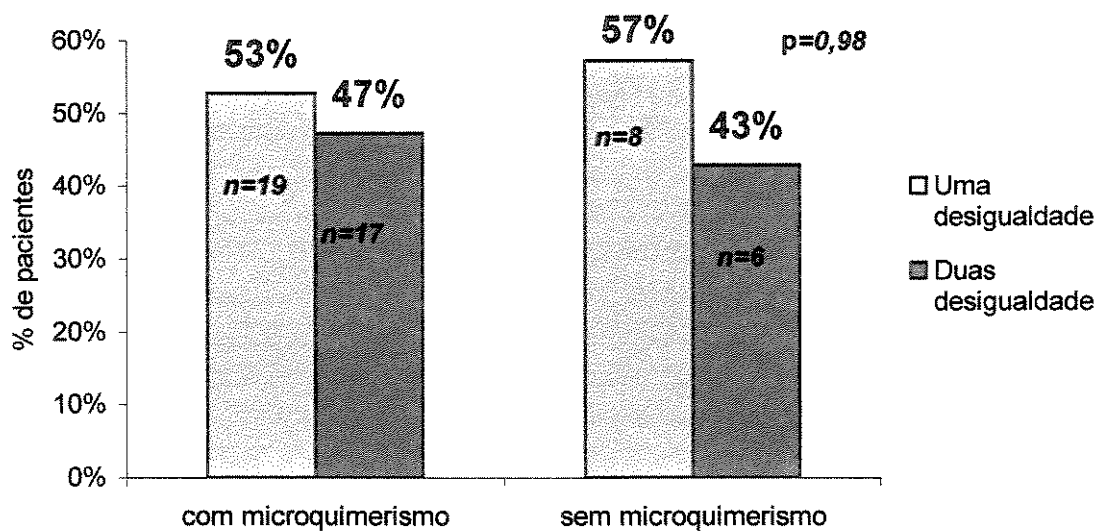


Figura 6-Presença de microquimerismo e desigualdades HLA-DRB1. O valor de $p=0,98$ pelo teste exato de Fischer não foi estatisticamente significativo, quando se associou presença ou ausência de microquimerismo e número de desigualdades HLA-DRB1.

4.9-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES COM MICROQUIMERISMO E SEM REJEIÇÃO EM RELAÇÃO ÀS DESIGUALDADES HLA-DRB1

A análise do tempo de sobrevida dos 26 pacientes que apresentaram microquimerismo sem rejeição, em relação às desigualdades HLA-DRB1, mostrou que o tempo de sobrevida é semelhante tanto nos pacientes com microquimerismo sem rejeição, quanto nas desigualdades, conforme mostra a figura 7.

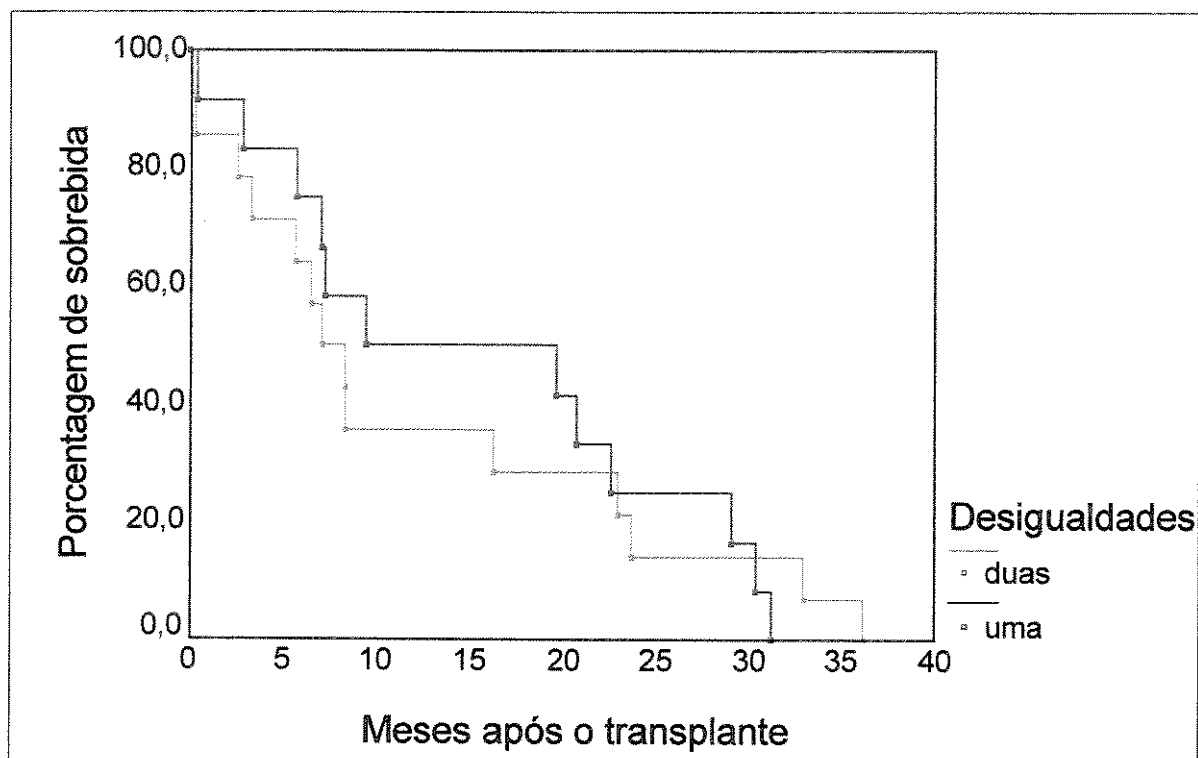


Figura 7-Tempo de sobrevivência dos pacientes em relação às desigualdades HLA-DRB1. A comparação Log Rank não mostrou diferença significativa ($p=0,96$) entre o grupo de pacientes, quando se associou microquimerismo sem rejeição e desigualdades HLA-DRB1.

4.10-ANÁLISE DAS COMPATIBILIDADES DOS ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1 NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Nos receptores/doadores foi realizada a análise das compatibilidades dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1, conforme indica a tabela 5.

Tabela 5-Presença de alelos HLA-DRB1 e -DQB1 nos receptores e doadores e número de desigualdades entre os dois grupos avaliados

<i>Pacientes</i>	<i>Alelos HLA-DRB1</i>		<i>Desigualdades DRB1</i>	<i>Alelos HLA-DQB1</i>		<i>Desigualdades DQB1</i>
	<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>		<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>	
1. VAG	*01,*07	*03,*11	2	*05,*02	*02,*06	1
2. JRP	*07	*04,*14	2	*02	*05,*05	1
3. EIJ	*13	*04,*08	2	*06	*03,*04	2
4. JRJ	*03	*01,*13	2	*02	*05,*06	2
5. JL	*15,*03	*01,*03	1	*06,*02	*05,*02	1
6. HCS	*15,*16	*04,*15	1	*05,*06	*03,*03	1
7. LB	*03,*13	*04,*16	2	*02,*03	*03,*05	1
8. TMAM	*07,*11	*11,*15	1	*02,*06	*03,*06	1
9. GAF	*13,*15	*08,*14	2	*06,*06	*06,*06	idênticos
10. NAM	*04	*03,*07	2	*05,*06	*03,*04	2
11. AC	*12,*15	*07,*15	1	*05,*06	*02,*06	1
12. SF	*15,*03	*07,*15	1	*05,*02	*02,*06	1
13. PAB	*13,*14	*01,*03	2	*05,*06	*05,*02	1
14. LST	*11	*11,*08	1	*05,*06	*03,*04	2
15. MAAC	*07,*15	*07,*08	1	*02,*06	*07,*08	2
16. AC	*03,*08	*16,*08	1	*02,*04	*03,*04	1
17. PCG	*11,*16	*03,*16	1	*03,*05	*03,*04	1
18. CF	*13,*10	*03,*10	1	*02,*05	*02,*05	idêntico
19. AZ	*04,*11	*07	2	*03,*03	*02,*03	1
20. NR	*03,*14	*03,*11	1	*02,*05	*03,*06	2
21. VC	*04,*08	*07,*08	1	*03,*04	*02,*04	1
22. LLL	*07	*03,*15	2	*02,*06	*02,*06	idêntico
23. JB	*13,*10	*03,*10	1	*05,*06	*03,*05	1
24. MAV	*07,*13	*01	2	*02,*06	*05	1
25. JB	*07,*12	*11,*12	1	*03	*03,*05	1
26. JRC	*08,*14	*13,*14	1	*04,*05	*05,*06	1
27. FC	*07,*16	*07,*13	1	*02,*05	*02	1
28. FAG	*07	*01,*15	2	*02	*05,*06	2
29. ADCF	*11	*01,*13	2	*03	*05,*06	2
30. MBR	*04,*15	*11,*15	1	*03,*06	*03,*06	idênticos
31. AVG	*07,*11	*11,*13	1	*03,*03	*03	idênticos
32. GOP	*10,*15	*11,*13	2	*05,*06	*03,*06	1
33. TC	*08,*16	*07,*15	2	*04,*05	*03,*06	2
34. SOP	*07	*07,*11	1	*02	*02,*03	1
35. RSSS	*08,*09	*01,*07	2	*03	*02,*05	2

<i>Pacientes</i>	<i>Alelos HLA-DRB1</i>		<i>Desigualdades DRB1</i>	<i>Alelos HLA-DQB1</i>		<i>Desigualdades DQB1</i>
	<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>		<i>Receptores</i>	<i>Doadores</i>	
36. JA	*13,*07	*01,*11	2	*06,*02	*03,*05	2
37. OAF	*03,*11	*08,*13	2	*02,*03	*04,*06	2
38. MAL	*03,*04	*01,*13	2	*02,*03	*05,*06	2
39. SMMY	*04,*13	*11,*13	1	*04,*06	*03,*06	1
40. MCA	*03,*07	*11,*13	2	*02,*05	*03,*06	2
41. ASBF	*07,*13	*04,*11	2	*03,*06	*03	1
42. DDFP	*04,*15	*13,*14	2	*03,*06	*03,*05	1
43. DS	*03,*15	*15,*16	1	*02,*06	*06	1
44. MLG	*03,*07	*03,*10	1	*02	*02,*05	1
45. JB	*11,*16	*08,*11	1	*03,*05	*03	1
46. VPM	*04,*07	*13,*15	2	*02	*05,*06	2
47. MCZ	*04,*13	*03,*13	1	*03,*06	*02,*05	2
48. JCJN	*03,*11	*01,*08	2	*03,*04	*04,*05	1
49. ARC	*12,*07	*03,*11	2	*02,*05	*03,*06	2
50. VLCP	*03	*01,*03	1	*02	*02,*05	1

4.11-ANÁLISE DAS DESIGUALDADES HLA-DRB1 NA REJEIÇÃO NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Dos 27 receptores/doadores que apresentaram uma desigualdade para o alelo HLA-DRB1, 12 receptores (44%) apresentaram rejeição e 15 receptores (56%) não apresentaram rejeição. Similarmente, dos 23 pares receptores/doadores que apresentaram duas desigualdades, 5 receptores (22%) apresentaram rejeição e 18 receptores (78%) não apresentaram rejeição, conforme ilustra a figura 8.

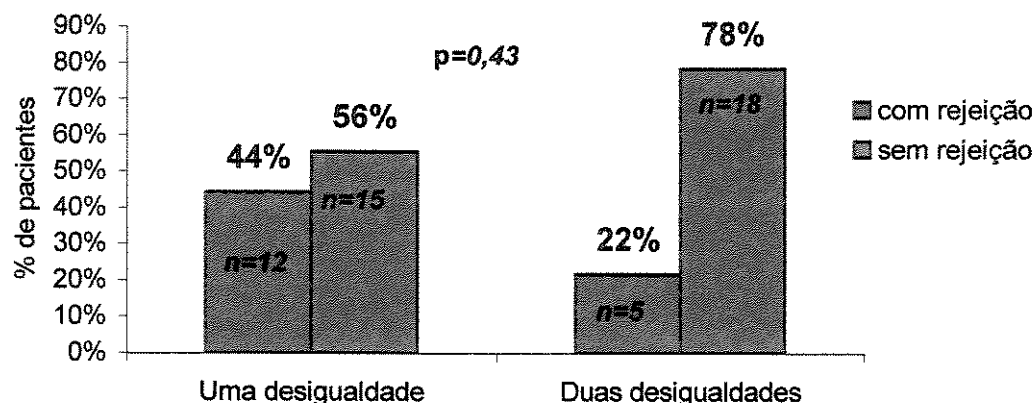


Figura 8-Análise das desigualdades HLA-DRB1 nos pares receptores/doadores associados com a rejeição. O valor de $p=0,43$ pelo teste exato de Fischer não foi estatisticamente significativo, quando se associou o grupo de pacientes com uma e duas desigualdades, e a rejeição após o transplante de fígado.

4.12-ANÁLISE DAS DESIGUALDADES HLA-DQB1 NA REJEIÇÃO NOS PARES RECEPTORES E DOADORES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Dos 28 receptores/doadores que apresentaram uma desigualdade para o alelo HLA-DQB1, 10 receptores (36%) apresentaram rejeição e 18 receptores (64%) não apresentaram rejeição. Dos 17 pares receptores/doadores que apresentaram duas desigualdades, 5 receptores (29%) apresentaram rejeição e 12 receptores (71%) não apresentaram rejeição. Entre os 5 pares receptores/doadores idênticos, 2 receptores (40%) apresentaram rejeição e 3 receptores (60%) não apresentaram rejeição. Como pode ser observado na figura 9, o número de pacientes que recebeu uma ou duas desigualdades e o número de pacientes que foram idênticos no -DQB1 apresentaram menos episódios de rejeição aguda.

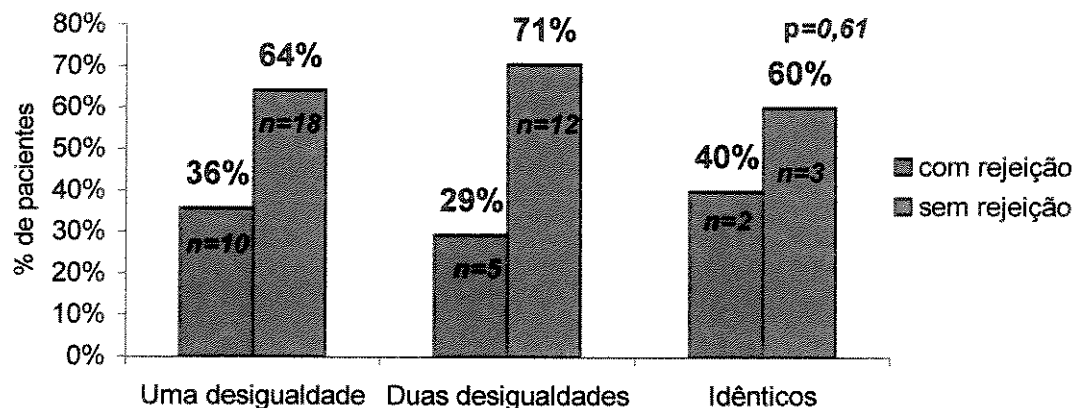


Figura 9-Análise das desigualdades HLA-DQB1 nos pares receptores/doadores associados com a rejeição. O valor de $p=0,61$ pelo teste exato de Fischer não foi estatisticamente significativo, quando se associou o grupo de pacientes com uma e duas desigualdades, e a rejeição após o transplante de fígado.

4.13-AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1 ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES SADIOS

A primeira coluna da tabela representa as diferentes especificidades desses alelos determinados por PCR/SSP e as demais colunas mostram as frequências dos alelos (valores expressos em porcentagem), os valores de χ^2 , risco relativo e o valor de p nos pacientes e controles sadios, como mostra a tabela 6.

Tabela 6-Distribuição das frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA-DRB1*, -DRB3*, -DRB4*, -DRB5* e -DQB1* nos pacientes submetidos ao transplante de fígado e no grupo controle.

HLA-DRB1	Pacientes n = 50	Controles n=100	χ^2	RR	p
DRB1*01	1 (2,0%)	21 (21,0%)	9,69	0,07	0,0019 ¹
DRB1*15	10 (20,0%)	15 (15,0%)	0,60	1,41	0,43
DRB1*16	4 (8,0%)	11 (11,0%)	0,36	0,70	0,74
DRB1*03	10 (20,0%)	13 (13,0%)	1,25	1,67	0,26
DRB1*04	9 (18,0%)	35 (35,0%)	4,64	0,40	0,03 ²
DRB1*11	9 (18,0%)	27 (27,0%)	1,59	0,59	0,20
DRB1*12	3 (6,0%)	3 (3,0%)	0,78	2,06	0,37
DRB1*13	10 (20,0%)	27 (27,0%)	0,68	0,6	0,40
DRB1*14	3 (6,0%)	7 (7,0%)	0,04	0,84	0,84
DRB1*07	16 (32,0%)	20 (20,0%)	2,63	1,88	0,10
DRB1*08	4 (8,0%)	10 (10,0%)	0,15	0,78	0,69
DRB1*09	1 (2,0%)	2 (2,0%)	0,00	1,00	1,00
DRB1*10	3 (6,0%)	2 (2,0%)	0,61	0,79	0,43
DRB3*	33 (66,0%)	71 (71,0%)	0,39	0,79	0,53
DRB4*	23 (46,0%)	53 (53,0%)	0,65	0,75	0,41
DRB5*	12 (24,0%)	26 (26,0%)	0,07	0,89	0,79
DQB1*05	17 (34,0%)	35 (35,0%)	0,01	0,95	0,89
DQB1*06	21 (42,0%)	35 (35,0%)	0,00	1,00	1,00
DQB1*02	23 (50,0%)	33 (33,0%)	2,40	1,72	0,04 ³
DQB1*03	15 (30,0%)	66 (66,9%)	17,39	0,22	0,0001 ⁴
DQB1*04	6 (12,0%)	14 (14,0%)	0,11	0,83	0,73

¹pc=0,024

²pc=NS (Não Significante)

³pc=NS

⁴pc=0,001

n= número de pacientes e controles

4.14-AVALIAÇÃO DE ALELOS HLA-DRB1 E -DQB1 NOS 50 PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE FÍGADO E 100 CONTROLES SADIOS

No total de pacientes analisados, os alelos HLA-DRB1*01 (RR=0,07, $\chi^2=9,69$ e $p=0,0019$); DRB1*04 (RR=0,40, $\chi^2=4,64$ e $p=0,03$) e DQB1*03 (RR=0,22, $\chi^2=17,39$ e $p=0,0001$) apresentaram uma associação negativa junto ao transplante de fígado, enquanto o alelo DQB1*02 (RR=1,72, $\chi^2=2,40$ e $p=0,04$) apresentou uma associação positiva junto ao transplante. Foi calculado o p corrigido (pc) para todos os valores de significância. A figura 10 mostra a comparação das frequências dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 entre os pacientes, após o transplante de fígado, e o grupo-controle de indivíduos de sadios.

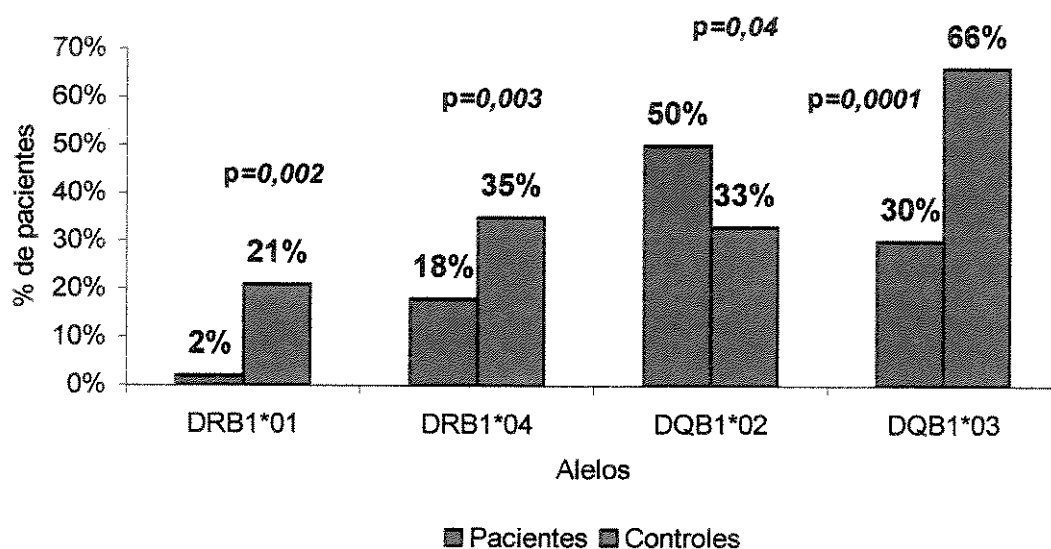


Figura 10-Frequências dos alelos HLA-DRB1, -DQB1 entre os pacientes e os controles sadios.

4.15-AVALIAÇÃO DO ALELO DRB1*15 NOS PACIENTES APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

Conforme indicado na tabela 7, o alelo HLA-DRB1*15 esteve presente em 10 pacientes dos 50 estudados e em 15 controles sadios dos 100 estudados.

Quando associadas essas frequências (20% vs 15%), notou-se que não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p=0,43$). Quando analisada a frequência dos 10 pacientes que apresentaram o alelo DRB1*15, 6 deles morreram e 4 pacientes permaneceram vivos (60% vs 40%), mostrando uma associação significativa ($p=0,007$, $OD=8,5$) que sugere que os pacientes com alelo DRB1*15 têm aproximadamente 8,5 vezes mais chances de ir a óbito, conforme ilustra a figura 11.

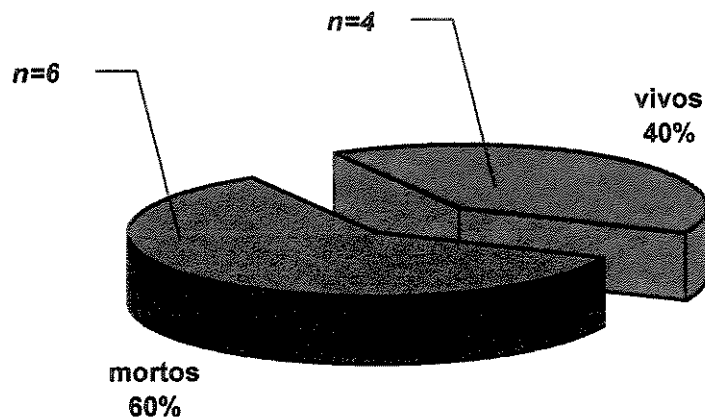


Figura 11-Freqüência do alelo HLA-DRB1*15 nos pacientes após o transplante de fígado.

4.16-AVALIAÇÃO DO ALELO HLA-DRB1*15011 ENTRE OS PACIENTES MORTOS E VIVOS

A partir da constatação de que o alelo HLA-DRB1*15 mostrou estar associado com a mortalidade dos pacientes, após o transplante de fígado, foi realizada a tipagem HLA-DRB1 em nível de alta resolução nos pacientes vivos e mortos que apresentaram o HLA-DRB1*15, conforme indicado na tabela 7. Observou-se que dos 10 pacientes DRB1*15, 7 pacientes apresentaram HLA-DRB1*15011 e, desses pacientes, 5 morreram (71%) e 2 permaneceram vivos (29%), mostrando uma associação altamente significativa ($p=0,0001$, $OR=12,85$) no grupo de pacientes que morreram e apresentaram o alelo HLA-DRB1*15011, como ilustra a figura 12.

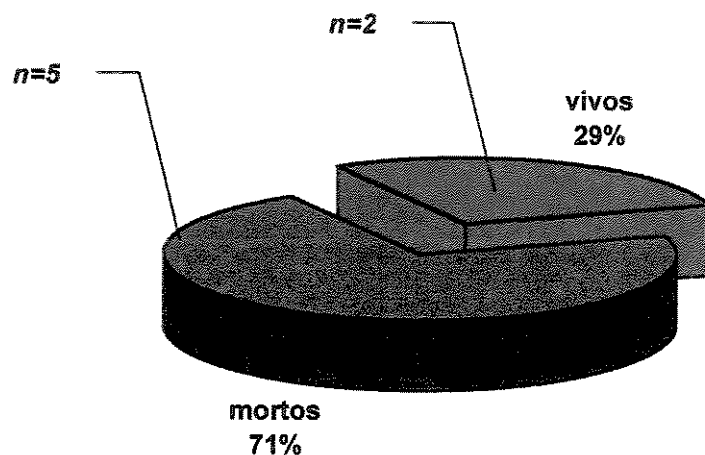


Figura 12-Avaliação do alelo HLA-DRB1*15011 entre os pacientes mortos e vivos.

Tabela 7-Receptores de transplante de fígados, vivos e mortos, com a presença de alelo HLA-DRB1*15

<i>Pacientes</i>	<i>Vivo (V) Óbito (O)</i>	<i>Alelos HLA-DRB1 Baixa Resolução</i>	<i>Alelos HLA-DRB1 Alta Resolução</i>
1. JL	V	*03 *15	03011, 1503
2. HCS	M	*06*05	*16021, *15011
3. GAF	M	*13*15	*1301, *15010
4. A C	M	*12*15	*1207, *15011
5. SF	V	*03, *15	*07011, *15011
6. MAAC	M	*07*15	*07011, *15011
7. MBR	M	*04*15	*04011, *15011
8. GOP	M	*10*15	*10011, *15011
9. DFP	V	*04*15	*0404, *15011
10. DS	V	*03*15	*0301, *1501

4.17-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO EM RELAÇÃO AO ALELO DRB1*15011

A análise do tempo de sobrevida dos pacientes, após o transplante de fígado, com relação aos pacientes que possuem, ou não, o alelo DRB1*15011, mostrou que o tempo de sobrevida é semelhante nos pacientes com a presença, ou ausência, desse alelo. A figura 13 mostra as curvas de sobrevida representadas pela presença do alelo DRB1*15011 (7 pacientes) e a ausência do alelo DRB1*15011 (3 pacientes).

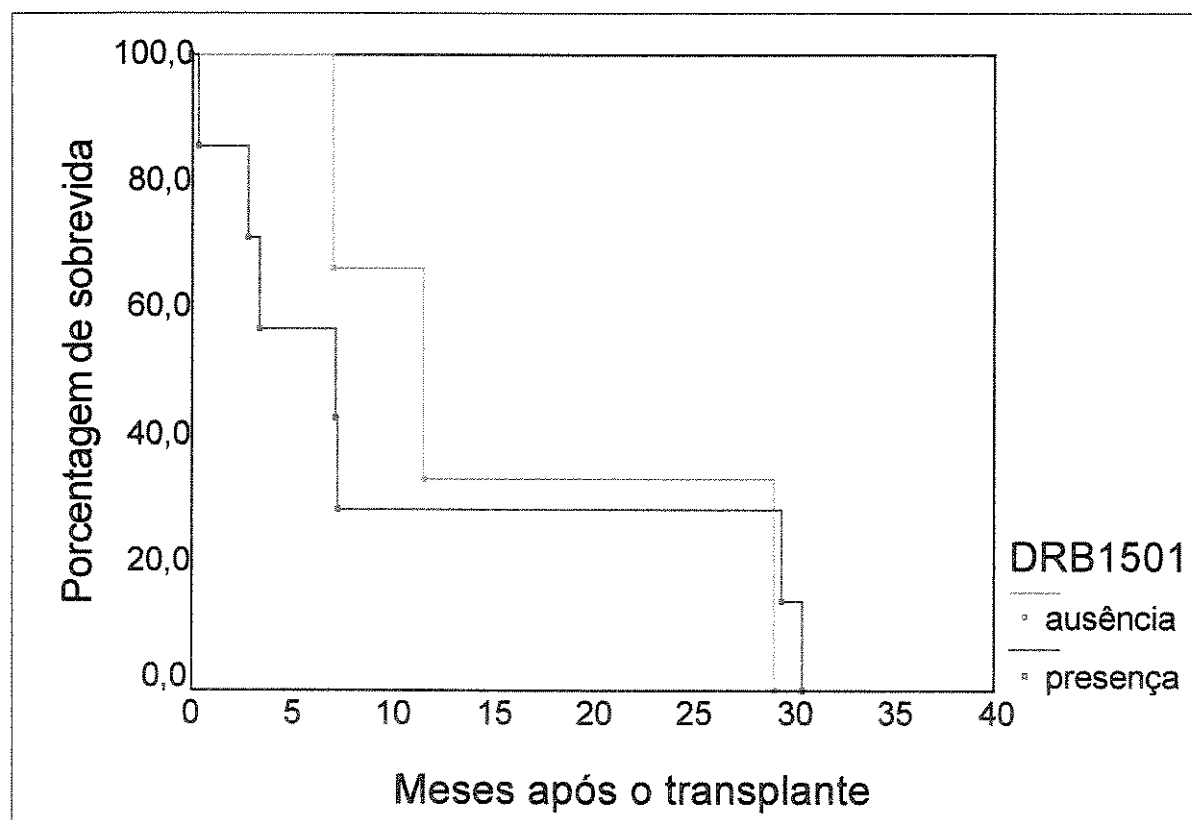


Figura 13-Tempo de sobrevida dos pacientes após o transplante de fígado que possuem, ou não, o alelo DRB1*15011. A comparação Log Rank não mostrou diferença significativa ($p=0,71$) entre o grupo de pacientes com a presença, ou ausência, do alelo HLA-DRB1*15011.

4.18-DETERMINAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE I NOS PACIENTES PRÉ E PÓS-TRANSPLANTE DE FÍGADO

Anticorpos anti-HLA de classe I foram avaliados nos soros dos pacientes estudados nas fases pré e pós-transplante, através da Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC). A reação foi considerada positiva, quando a reatividade frente aos alelos testados foi superior a 10%. Todos os anticorpos detectados foram do tipo IgG. A detecção de anticorpos anti-HLA de classe I na fase pré e pós-transplante em 44/50 dos pacientes (88%) apresentou ausência de anticorpos, 2/50 dos pacientes (4%), com anticorpos no pré-transplante e 4/50 no pós-transplante (8%), conforme mostra a figura 14.

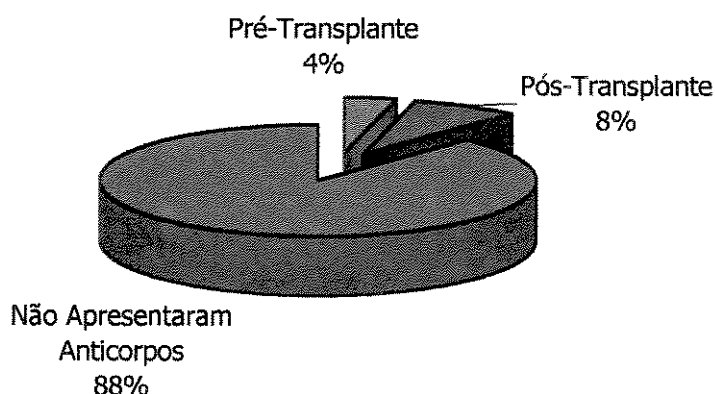


Figura 14-Detecção de Anticorpos Anti-HLA de Classe I na fase pré e pós-transplante nos 50 pacientes estudados.

4.19-DETERMINAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE II NOS PACIENTES PRÉ E PÓS-TRANSPLANTE DE FÍGADO

Anticorpos anti-HLA de classe II foram avaliados nos soros dos pacientes estudados nas fases pré e pós-transplante, através da Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC). A reação foi considerada positiva, quando a reatividade frente aos alelos testados foi superior a 10%. Todos os anticorpos detectados foram do tipo IgG. Na

detecção de anticorpos anti-HLA de classe II, 16/50 dos pacientes (68%) não apresentaram anticorpos e 7/50 dos pacientes com anticorpos (14%), no pré-transplante e 9/50 dos pacientes (18%) apresentaram anticorpos anti-HLA de classe II, no pós-transplante, conforme mostra a figura 15. Na fase pós-transplante, foi encontrado um número maior de anticorpos anti-HLA de classe I e classe II. A associação entre os anticorpos HLA de classe I e classe II, no pré e pós-transplante hepático e microquimerismo, não mostrou estatisticamente significativa, como também entre a rejeição e esses anticorpos não houve nenhuma associação.

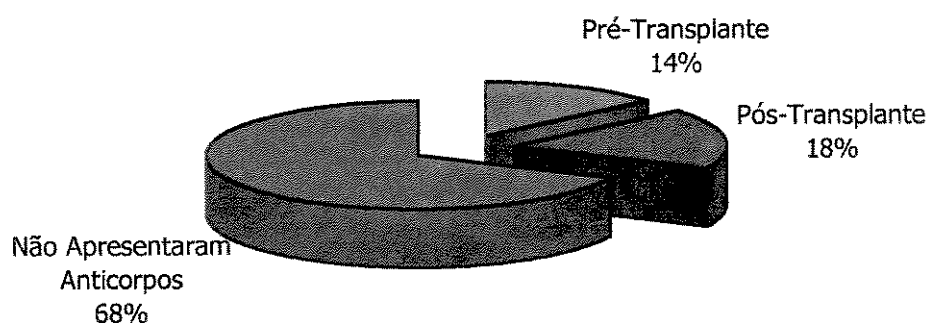


Figura 15-Detecção de anticorpos anti-HLA de classe II na fase pré e pós-transplante nos 50 pacientes estudados

4.20-ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS PACIENTES, APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO, EM RELAÇÃO AOS SEXOS MASCULINO E FEMININO

A análise do tempo de sobrevida do paciente, com relação aos sexos masculino e feminino, mostrou que a probabilidade de sobrevivência, depois de determinado tempo, foi maior para os homens do que para as mulheres, conforme mostra a figura 16.

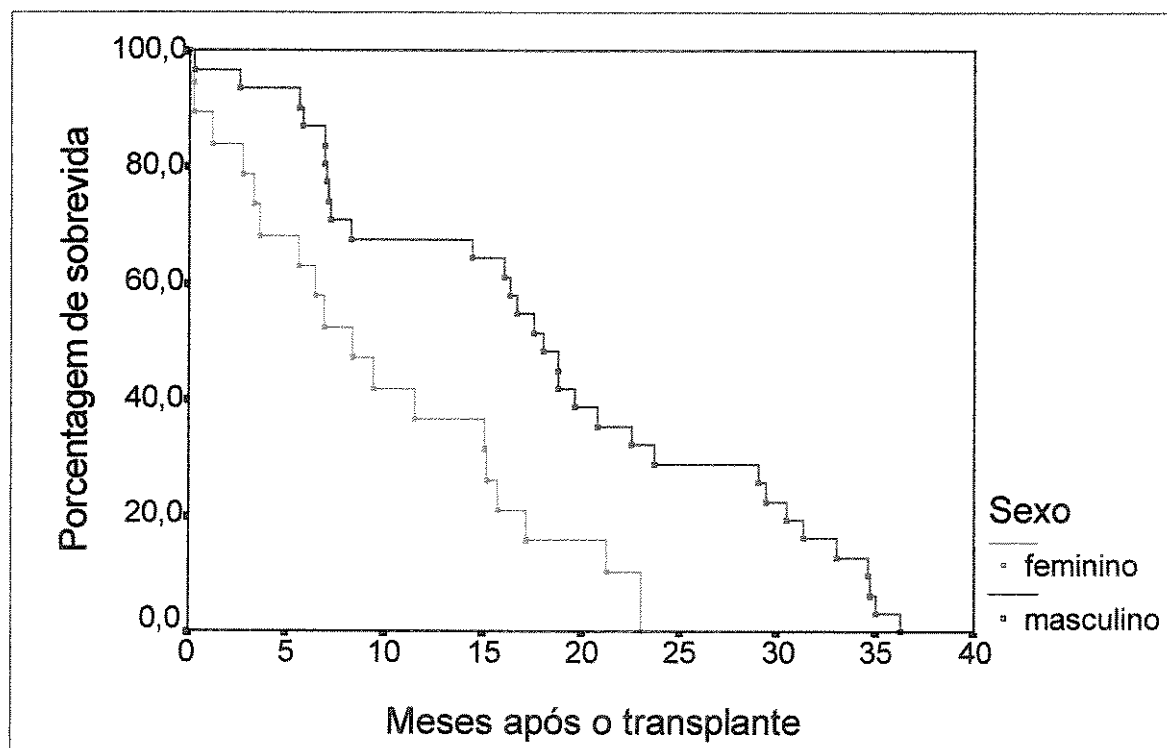
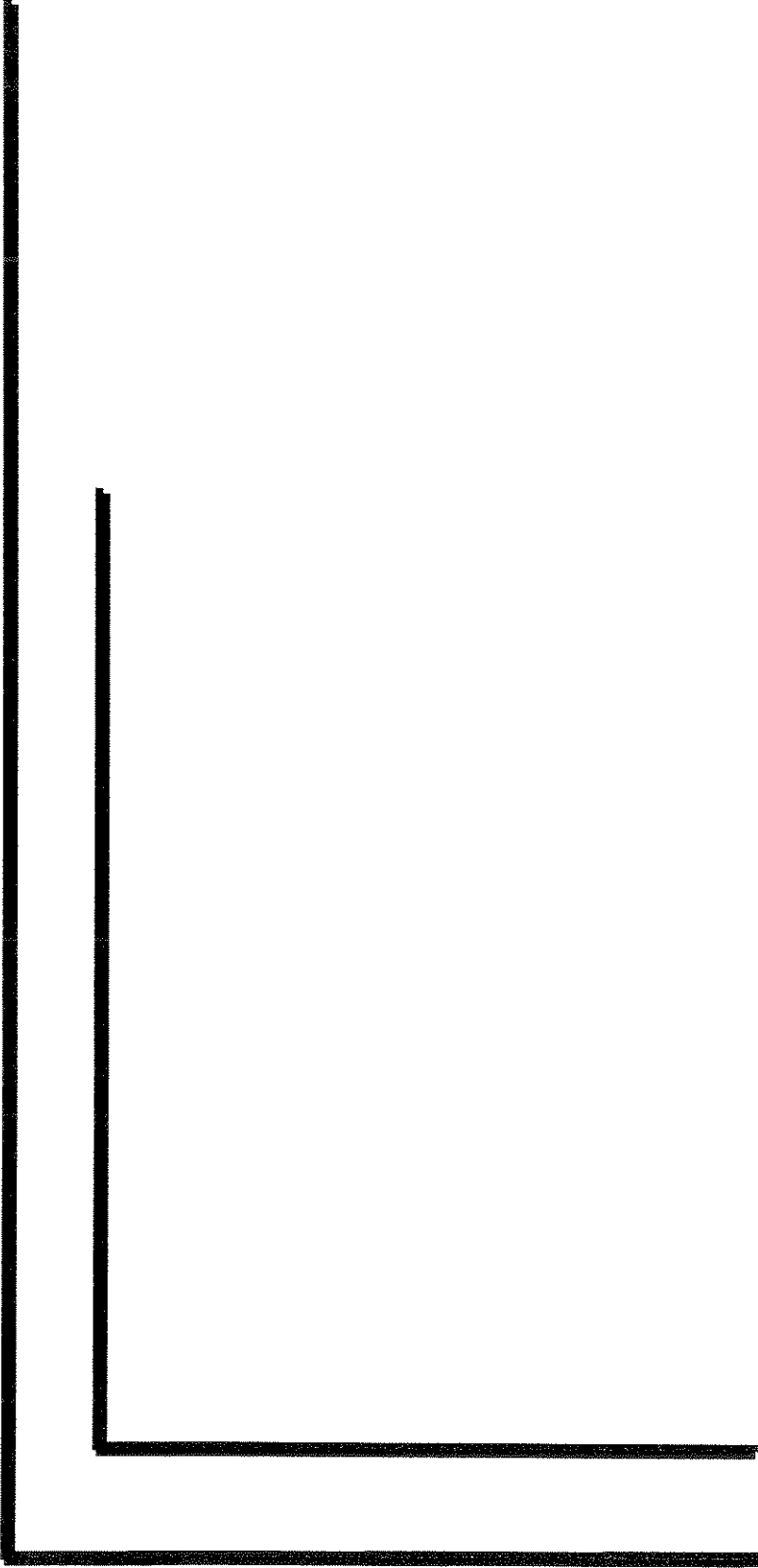


Figura 16-Tempo de sobrevida dos pacientes, após o transplante de fígado, com relação aos sexos masculino e feminino. A comparação Log Rank mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,036$)



5- DISCUSSÃO

O transplante de fígado constitui-se na modalidade terapêutica definitiva para as doenças de fígado, em estágio terminal. O objetivo primordial, após o êxito de um transplante, bem sucedido, visa atingir a indução e a manutenção de uma tolerância imunológica específica do órgão transplantado sem a administração prolongada de agentes imunossupressores.

Desde que o conceito de microquimerismo foi relatado por STARZL e colaboradores (1993b), o impacto desse fenômeno na tolerância do enxerto doador-específico ainda permanece questionável, sendo que a grande maioria das análises que envolvem o microquimerismo doador-específico é realizada em receptores com tempo de sobrevida prolongada. E mais importante, ainda não se encontra, claramente, compreendida a correlação entre microquimerismo alogênico, episódios de rejeição e prolongamento do tempo de sobrevida em receptores de aloenxertos de fígado.

A fim de investigar esse tema, esse estudo analisou, inicialmente, o estado do microquimerismo nos leucócitos do sangue periférico de 50 receptores após o transplante de fígado; no corrente estudo, demonstramos a natureza órgão-específica para a detecção do microquimerismo, bem como a sua correlação com o tipo de reatividade doador-específico. E ainda, a associação entre microquimerismo, incidência de rejeição aguda e sobrevida dos pacientes após o transplante de fígado. Concomitante e posteriormente, avaliou-se, no mesmo grupo de pacientes, o papel dos demais fatores imunogenéticos associados ao transplante de fígado.

No macroquimerismo, as células persistentes, específicas do doador, são facilmente detectáveis, por citometria de fluxo, nos diversos níveis até 100%, normalmente, após transplante de medula óssea mieloablativo e demais transplantes de células (FERRAND et al., 2003). O microquimerismo compreende um percentual pequeno de células do doador (1×10^4 , 10^5 ou menos), freqüentemente detectáveis por técnicas moleculares e, basicamente, consistindo de células positivas para os genes HLA de classe II (FERRAND et al., 2003). Uma vez que o microquimerismo é um fenômeno de freqüência baixa e comum em indivíduos sadios, foi essencial, nesse estudo, uma atenção cuidadosa para os métodos técnicos e cuidadosos planejamentos da pesquisa para corroborar as conclusões e avançar os conhecimentos nessa área médica.

Os primeiros trabalhos enfatizaram a inconsistência na detecção do microquimerismo nos receptores de transplantes. Um dos primeiros trabalhos relatou a detecção do microquimerismo periférico em 15 pacientes com aloenxertos de rim de cadáveres, todos funcionando muito bem por mais de 15 anos (SUBERBIELE et al., 1994). Nesses primeiros estudos, eram empregadas as técnicas convencionais de reações da polimerase em cadeia com primers de sequência específica PCR/SSP. Constatou-se por essa técnica que somente um terço dos receptores demonstraram quimerismo no sangue periférico (SCHLITT et al., 1995).

Na detecção do microquimerismo de genes HLA-DRB1, padronizou-se ensaios da *nested PCR/SSP* em duas etapas: através de uma primeira amplificação genérica das sequências do exon 2 do gene HLA-DRB1, pela amplificação da polimerase com pares de primers designados para amplificar somente os alelos desejados (SCHARF et al., 1989) e uma segunda amplificação do produto da primeira amplificação genérica, utilizando primers específicos de alelos do doador. Para determinar os diferentes aspectos no controle de qualidade na detecção do microquimerismo, estabeleceu-se, nessa pesquisa, um sistema de referência levando em consideração: a) o grau de magnitude do sistema de detecção dependente de duas PCR/SSP e o uso de um painel de primers contendo as sequências alélicas do exon 2 do gene HLA-DRB1 contendo todas as especificidades HLA, em nível de resolução intermediária; b) foram excluídas falsas amplificações positivas, geralmente, devidas a cruzamentos de primers específicos do doador com alelos HLA-DR derivados do hospedeiro, pela especificidade do primer usado como controle interno e positivo do ensaio.

Na presente investigação, o estudo das amostras de doadores e receptores e a prova confirmatória da presença do microquimerismo alogênico foram obtidos através da amplificação pela PCR das amostras do receptor e realizadas com os pares de primers correspondendo aos alelos HLA-DRB1 específicos do doador (tabela 3).

A análise do microquimerismo mostrou uma positividade nos produtos da *nested PCR/SSP* indicando a presença de células do doador nas amostras do receptor em 36 pacientes dos 50 estudados (72%). De maneira similar, os dados da literatura (MULLIS e FALOONA, 1987; BEIN et al., 1992) mostraram uma maior eficácia na amplificação dos alelos do doador utilizando uma pré-amplificação no DNA (*nested PCR/SSP*) do que no

DNA genômico (PCR/SSP), particularmente quando ocorre um pequeno número de células mononucleares do doador no sangue periférico de receptores.

Nossos resultados vêm ao encontro dos trabalhos iniciais (KNOPP et al., 1994; MORGAN et al., 1993) que mostraram ser a abordagem por *nested PCR/SSP* consideravelmente mais sensível na detecção do microquimerismo do que os ensaios simples da PCR/SSP.

Ao mesmo tempo, a análise de desigualdades dos alelos HLA-DRB1, nos pares de receptores e de doadores, revelou que o microquimerismo foi detectado, no sangue periférico após o transplante de fígado, em 70% dos pacientes apresentando uma desigualdade, e em 74% dos pacientes apresentando duas desigualdades (tabela 4). Esses achados vêm ao encontro dos demais estudos prévios, igualmente empregando a *nested PCR/SSP* na detecção do microquimerismo (HISANAGA et al., 1996; SPRIEWALD et al., 1998). Além disso, nossos dados sugerem que a relação na detecção do microquimerismo foi dependente de desigualdades HLA-DR nos pares avaliados (figura 6).

A literatura tem explorado o fato de desigualdades cumulativas de alelo HLA-DR presentes nos receptores aumentarem a chance de detectar o microquimerismo, quando comparadas com uma só igualdade. Uma possível exploração para esse fato parece envolver diferenças na eficiência de amplificação, podendo dar diferenças nos limites da detecção, provavelmente, devido à variabilidade alélica individual, relacionadas ao tipo de sequência e com primer designado (JOSEPH et al., 1999). Com relação aos nossos dados, essa explicação pode estar relacionada com aqueles pacientes nos quais não foi possível detectar o microquimerismo (figura 6).

No presente estudo, a migração de leucócitos do doador do órgão transplantado para os tecidos extra-hepáticos foi constatada no sangue periférico dos receptores, logo no início do transplante até 16 meses (figura 2), sendo detectado o microquimerismo em 72% do total de pacientes estudados (figura 3). Recentemente, frequências similares foram documentadas em demais pacientes pós-transplante de fígado (SPRIEWALD et al., 1998; CRESPO-LEIRO et al., 2002)

Até o presente, no entanto, ainda não está esclarecida a importância clínica do microquimerismo. A dúvida permanece com relação à contribuição do quimerismo misto, onde a presença concomitante de células hematopoiéticas circulantes do doador e do

receptor podem desempenhar um papel nas consequências imunológicas do microquimerismo, tanto no aceite do órgão por um prolongamento de sobrevida do paciente, bem como na possibilidade da redução ou interrupção da terapia imunossupressiva (FERRAND et al., 2003).

Os pacientes por nós analisados apresentaram ausência de microquimerismo e tiveram, significativamente, mais episódios de rejeição aguda (64%) do que aqueles pacientes com presença de microquimerismo (28%); figura 4.

Como o método *nested PCR/SSP* não fornece informações da localização ou viabilidade do genótipo do doador, acreditamos que a elucidação desses fatores possa levar a um maior entendimento do fenômeno do microquimerismo específico do doador, principalmente entendido como um mecanismo de desenvolvimento da tolerância clínica (STARZL et al., 1993b; CRESPO-LEIRO et al., 2002, MONACO e MEDAWAR, 2003) e não como mera consequência da mesma. É possível que o microquimerismo possa ter, no hospedeiro, efeitos prejudiciais, neutros ou benéficos devido à associação de demais fatores, especialmente os genes HLA específicos e sua relação nas células do hospedeiro (LAMBERT et al., 2003).

Nos humanos, os mecanismos imunológicos que propiciam o aceite do aloenxerto e a tolerância do aloenxerto por um período prolongado permanecem inconclusivos, podendo incluir anergia, supressão de clones aloreativos e específicos de células T e deleção clonal de células T doador reativas (DALLMAN et al., 1993; CHARLTON et al., 1994). Inicialmente, STARZL et al. (1992a); STARZL et al.(1993a); STARZL et al.(1992b); STARZL et al.(1993b) propuseram uma nova hipótese a respeito de aceite do enxerto, postulando que as células dendríticas do doador, ao migrarem do enxerto para a periferia do receptor, se estabeleceriam como células do receptor, em locais distantes tais como: a pele, o pulmão e os linfonodos. Esse intercâmbio de células era entendido como resultado de uma hiporesponsividade doador-específico, originando um estado de tolerância ao enxerto. Posteriormente, foi demonstrada a existência de células específicas do doador no receptor após transplante de fígado e avaliados linfócitos do doador em 1% a 24% do total de linfócitos periféricos do receptor, na primeira semana após o transplante de fígado. Células essas, determinadas por citometria de fluxo (SCHLITT et al., 1993), decrescendo rapidamente nas semanas decorrentes, porém ainda detectadas no sangue e

tecidos por PCR. Foi sugerido que a migração inicial das células do doador devia-se aos leucócitos passageiros do enxerto, com a subsequente liberação de células maduras, originadas de células progenitoras no enxerto (RUDERT et al., 1994). Entretanto, a importância imunológica do microquimerismo foi ampliada após a observação da correlação desse fenômeno com células específicas do doador e a rejeição do enxerto (SCHLITT et al., 1994b). Além disso, o microquimerismo não tem sido documentado em todos os enxertos estáveis por um longo período. Nos primeiros trabalhos referentes a seis centros que estudam o microquimerismo de fígado, alguns falharam ao documentar o microquimerismo periférico (ROLLES et al., 1994; RUBOCKI et al., 1994) e demais estudos relataram não haver uma correlação clínica entre microquimerismo e tolerância (HISANAGA et al., 1996; ELWOOD et al., 1997). Clinicamente, podem existir estados de microquimerismo com a ocorrência de rejeição (NORRIS, et al. 1997). Também a persistência do microquimerismo não se correlaciona, necessariamente, com a tolerância clínica, ou com critérios para redução das drogas imunossupressoras (STROBER et al., 2000).

Com respeito à importância imunológica do microquimerismo nesse estudo, pacientes com microquimerismo apresentaram menos episódios de rejeição do que aqueles que foram negativos, demonstrando uma associação ou significativa ao microquimerismo, sugerindo uma tendência (OR=4,7) para a incidência de rejeição nos pacientes sem microquimerismo (figura 4). A evidência da correlação entre o estado imunológico dos pacientes e as rejeições parecem ir ao encontro da hipótese de que o microquimerismo sistêmico desempenha um papel importante na hiporeatividade doador-específico e na tolerância (STARZL et al., 1992a; STARZL et al., 1993b)

Dados de vários estudos mostram que o microquimerismo não tem uma relação clara como estado imunológico dos pacientes após o transplante de fígado (HISANAGA et al., 1996; DEVLIN et al., 1998; McDANIEL et al., 1999). Além disso, os mecanismos que controlam a quantidade de células alogênicas podem diferir daqueles causadores da rejeição aguda, desde que a variação na intensidade do microquimerismo pareça ser independente do estado da rejeição (HISANAGA et al., 1996). A eliminação de células hematopoiéticas alogênicas parece ter um efeito nas células natural killer, enquanto o início da rejeição parece ser acionado por linfócitos T (CICCONE et al., 1992).

Até o momento, os fatores relacionados à inconsistência dos estudos relacionados ao microquimerismo alogênico podem ser devidos, pelo menos em parte, ao grande número de variáveis, tanto clínicas quanto laboratoriais que afetam os transplantes. Essas variáveis incluem: tamanho pequeno das amostras clínicas, grau de desigualdades entre o doador e receptor, duração e extensão da imunossupressão, origem tecidual e técnicas usadas na detecção do microquimerismo (McDANIEL et al., 1999; SAHOTA et al., 1998), sendo que os fatores que podem influenciar as consequências imunológicas do microquimerismo incluem: o nível de quimerismo, origem das células do doador, estado de maturidade do sistema imune do receptor, o órgão enxertado, a natureza das células persistentes derivadas do doador e a localização das células derivadas do doador (FERRAND et al., 2003).

SUN et al. (1997) observaram uma indução aumentada de interleucina-2 e interferon γ na expressão do RNA mensageiro, em linfonodos de ratos tolerantes comparados com aqueles que desenvolveram rejeição de enxerto após o transplante (SUN et al., 1997). Em pesquisas clínicas, a identificação de linhagens de células que migram para órgãos periféricos pode ser importante em futuros estudos. A coexistência de células apresentadoras de antígenos de origem tanto do doador quanto do receptor na periferia e no timo podem estar associadas à competência imunológica e também à tolerância recíproca. Na verdade, as células apresentadoras de antígenos do hospedeiro e do doador no timo deletam, durante a seleção negativa, células T reativas de ambos, hospedeiro e doador, sugerindo que, além do nível de microquimerismo, a natureza das células persistentes do doador pode, também, desempenhar um papel nas consequências imunológicas do microquimerismo (FERRAND et al., 2003).

Dados da literatura mostram que um excelente prolongamento da sobrevida pode ocorrer na ausência do microquimerismo e, mais importante, o microquimerismo ainda não pode ser usado como critério para a retirada do imunossupressor (MONACO e MEDAWAR, 2003).

Nossos resultados sugerem que baixos níveis de microquimerismo podem estar associados a baixos índices de aceitação do enxerto no início do transplante e à alta incidência de rejeição aguda. Estudos futuros serão necessários para confirmar esses achados em uma grande população de pacientes com transplante de fígado. De forma similar, as análises

clínicas não tiveram uma associação substancial entre microquimerismo e tolerância e/ou hiporesponsividade doador-específico, embora a rejeição do aloenxerto possa ter ocorrido, ou não, na presença do microquimerismo. Quanto à análise da sobrevida dos pacientes com transplante de fígado em relação ao microquimerismo, as desigualdades HLA-DRB1 e DRB1*15011 não apresentaram diferenças significantes, mostrando que o tempo de sobrevida foi semelhante nos pacientes com ou sem microquimerismo, desigualdades HLA-DRB1 e o alelo DRB1*15011. No entanto, quando comparada à sobrevida dos pacientes em relação ao sexo, observou-se que a probabilidade de sobrevida nos pacientes foi maior para os homens do que para as mulheres.

Concomitantemente, essa pesquisa, tendo como base relatos da literatura inconclusivos, analisou o impacto das compatibilidades HLA nos pacientes após transplante de fígado. Foram analisados 50 pacientes e seus doadores, usando técnicas de DNA para os genes HLA-DRB1 e DQB1. O impacto nas desigualdades HLA foi observado no decréscimo de incidência nos episódios de rejeição aguda entre o grupo de pacientes que recebeu duas desigualdades, tanto para os genes HLA-DRB1 quanto DQB1 (figura 6 e 7). Esses resultados sugerem um papel para os linfócitos derivados do fígado nas respostas imunes, logo no início do aceite do enxerto e, possivelmente, envolvido com microquimerismo. Os linfócitos derivados de fígado podem reagir contra células apresentadoras de aloantígenos de classe II, sendo esse, um fenômeno vantajoso na estabilização do microquimerismo e da tolerância (MARKUS et al., 1988b).

A tolerância foi, pela primeira vez reconhecida em 1965, quando GARNIER et al., observaram que enxertos de fígado transplantados entre porcos eram aceitos sem uso da terapia imunossupressiva. Ulteriormente, fatos similares de um aceite espontâneo foram evidenciados em ratos (COHN e BLOMBERG, 1975) e camundongo (CRESSWELL, 1994). O desenvolvimento, em camundongos, de modelos de transplante de fígado possibilitou a oportunidade de se obter um melhor conhecimento na regulação das respostas imunes no fígado, como resultado dos vastos conhecimentos do sistema imune e da genética no camundongo (HARGREAVES et al., 1997). O aceite espontâneo de aloenxertos de fígado é encontrado em todas as combinações de linhagens, incompatíveis para o MHC (CRESSWELL, 1994).

Experimentos recentes em diferentes modelos de roedores usando medula óssea para induzir macroquimerismo e tolerância mostrou que o estabelecimento do macroquimerismo não origina tolerância, necessariamente. Nesses modelos, para indução de tolerância era necessária a presença de células MHC Classe II positivas (BARTA et al., 2000).

Nesse estudo foi também investigada a frequência dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 nos receptores. Alguns alelos específicos do receptor, tais como HLA-DQB1*0302 têm sido associados com alto risco para a rejeição aguda e tolerância logo no início do transplante (MOYA-QUILES. et al., 2003)

Em contraste com transplantes de rim e coração, no transplante de fígado, a natureza das doenças subjacentes pode estar relacionada à alelos específicos, estando esse fato muito bem descrito para hepatite autoimune, hepatite B e C (BELLI et al., 2000). Similarmente, nossos dados mostraram que os pacientes com hepatite B ou C apresentaram uma diminuição dos genes HLA-DRB1*01, DRB1*04 e DQB1*03 e um aumento do alelo HLA DQB1*02. Portanto, uma investigação mais detalhada associando o transplante a doenças subjacentes será necessária, no futuro, para determinar o efeito da tipagem HLA nesse grupo de pacientes.

Nossos resultados também sugerem a importância da identificação do gene HLA-DRB1*15 no grupo de pacientes transplantados de fígado com a doença de base hepatite vírus C e morte após o transplante, onde foi verificada uma associação entre os pacientes com morte e que apresentavam o alelo HLA-DRB1*15011 (71%) e os pacientes vivos, que não apresentavam esse alelo (29%) e o valor de OR=12,85, indicando que a chance de um paciente ir a morte é de, aproximadamente, 12,85 vezes maior para aqueles pacientes que possuem o alelo DRB1*15011, em relação aos pacientes que não possuem esse alelo.

ECKELS et al.(2000) demonstra que a habilidade de liberação do vírus da hepatite C está associada a determinados alelos HLA, particularmente, HLA-DRB1*15. Esse fato foi observado nas células mononucleares derivadas de pacientes infectados com o vírus da hepatite crônica e HLA-DR15 positivos. Nesses pacientes, foi constatada a ocorrência natural da substituição de um só aminoácido no epítipo, NS3 da célula

TCD4-TH1 (DONNELLY et al., 1997; ZHU e ECKELS, 2002), ocorrendo falha na estimulação e proliferação de células TH1 que é acompanhada de uma mudança nos padrões de secreção das citocinas, demonstrando que a modificação no peptídeo pode inibir, efetivamente, a proliferação policlonal das células T periféricas do hospedeiro (WANG et al., 2003).

Com relação ao efeito de aloanticorpos imunoglobulina IgG, pré-formados e doador-específico em transplantes de fígado, os dados permanecem controversos, embora um número de estudos recentes sugira que esses anticorpos podem aumentar o risco de ambas as rejeições e de falha no enxerto, logo no início do transplante de fígado (TAKAYA et al., 1992; BARHGATE et al., 1998).

Entre 7% a 33% de receptores pós-transplante de fígado abrigam anticorpos citotóxico antidoador-específico. Aproximadamente, metade desses pacientes possui anticorpos IgG (DONALDSON e WILLIAMS, 1997). Estudos recentes têm confirmado que anticorpos imunoglobulina G linfocitotóxica, podem afetar, desfavoravelmente, o transplante de fígado (DEMETRIS et al., 1992). Inversamente, o transplante de fígado parece ser resistente a rejeições mediadas por anticorpos e os transplantes são realizados com sucesso, com incidência de provas cruzadas positivas anti-doador (KYUNG-SUK et al., 2002)

Os resultados do presente estudo demonstram uma falta de associação entre pacientes que apresentam anticorpos anti-HLA de classe I e classe II, no pré e pós-transplante e microquimerismo, assim como na rejeição. Uma possível razão para a pequena presença na positividade de anticorpos HLA, observada nesse estudo, parece estar relacionada ao método de detecção de anticorpos (MCKENNA et al., 2000). Técnicas mais recentes por Elisa e Citometria de Fluxo, utilizando antígenos HLA purificados, vêm mostrando a importância clínica pós-transplante para os anticorpos HLA, através do monitoramento pela: 1) detecção de baixos níveis de anticorpos do doador (BRENT, 1970); 2) diferenciação de anticorpos, isotipos e reativas contra antígenos HLA classe I e Classe II (PATEL e TERASAKI, 1969) e 3) correlação de anticorpos com a patologia específica do enxerto (PATEL e TERASAKI, 1969).

Na prática clínica, as tentativas para determinar igualdades dos antígenos HLA de doador e receptor são limitadas pela disponibilidade de órgãos de doador. Além da

contribuição relativa da homologia HLA entre o doador-receptor, o aceite do enxerto é influenciado pela composição, complexidade e tamanho do órgão. Assim, embora as igualdades HLA sejam desejáveis para os transplantes de órgãos em geral, parece existir uma importância maior nos transplantes de rim do que para transplantes de coração, pulmão ou fígado (OPELZ et al., 1999). Por outro lado, desigualdades, particularmente dos locos HLA classe II, estão correlacionadas com grande sucesso à obtenção da indução da tolerância periférica (COLOVAI et al., 1996).

Para a tolerância e sobrevida do enxerto, as compatibilidades HLA são reconhecidas, amplamente, como os fatores de maior importância nos transplantes renais e de coração (NEUMANN et al., 2003). Entretanto, o impacto das compatibilidades HLA na sobrevida dos transplantes de fígado ainda permanece indefinido, com diferentes grupos relatando resultados discrepantes (MARKUS et al., 1988b; NIKAEIN et al., 1994; DORAN et al., 2000; SAWYER et al., 2000).

Estudos prévios de linfócitos isolados de aloenxertos em fígado de humanos mostraram que essas células exibiam, *in vitro*, aloreatividade contra antígenos HLA do doador. KNECHTLE et al.(1993); FUNG et al.(1986); GUNSON et al.(1992); e SAIDMAN et al.(1990) relatam o efeito benéfico das compatibilidades do locus HLA-A nos resultados de transplantes de fígado. Esse dado é um forte argumento em favor dos mecanismos de aloreatividade da célula T na rejeição. Em contraste, uma série de autores associa as compatibilidades HLA a um alto grau de perda do enxerto, doenças recorrentes e infecção viral (MARKUS et al., 1988 a; MONEZ et al.,1993; MARKUS et al., 1988 b).

Finalmente, podemos concluir que a rejeição, no transplante, pelo sistema imune do hospedeiro envolve respostas específicas diretamente voltadas para grupos selecionados de aloantígenos polimórficos de histocompatibilidade expressos nos tecidos do doador. Estratégias para sustentar a supressão não-específica no sistema imune do hospedeiro têm propiciado a incorporação do órgão transplantado por um longo período, porém não sem seqüelas indesejáveis (por exemplo: infecções oportunistas, malignidades e toxicidade). Dessa forma, grandes esforços vêm sendo feitos para desenvolver métodos para alcançar e manter um estado de “tolerância imune” no hospedeiro que é caracterizado pela falta ou deleção de respostas imunes patológicas diretamente dirigidas ao órgão

enxertado, bem como preservar a habilidade do sistema imunológico para se adaptar e responder, apropriadamente, aos demais antígenos estranhos (FERRAND et al., 2003).

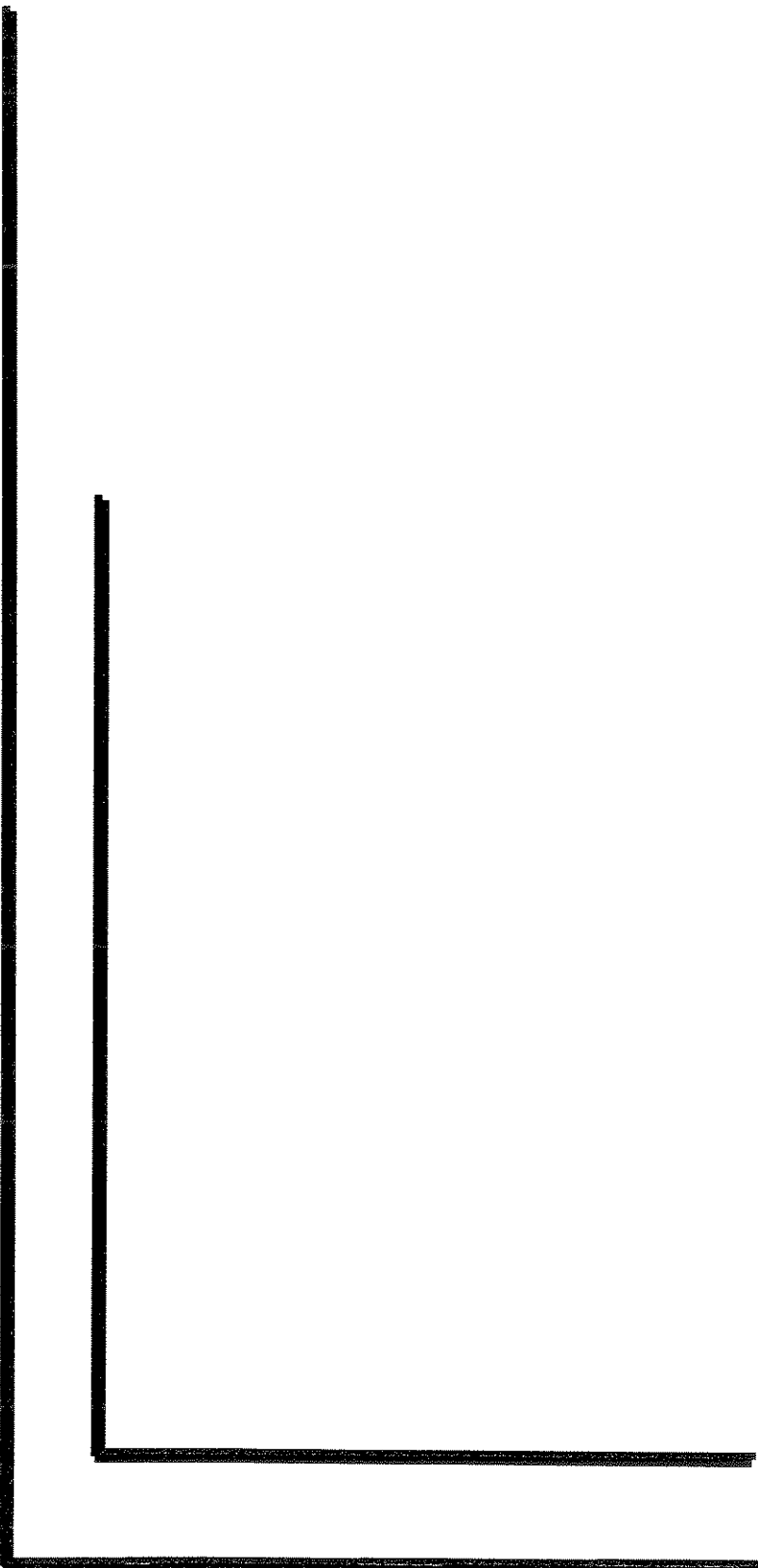
De uma maneira simples, o propósito da tolerância nos transplantes é convencer o sistema imune do hospedeiro a olhar o órgão aloenxertado vascularizado como parte da família dos tecidos do hospedeiro e dessa maneira desfrutar de proteção das respostas imunes do hospedeiro.

6- CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que o método *nested PCR/SSP* foi, suficientemente, sensível na detecção do microquimerismo alogênico que esteve presente na maioria dos pacientes estudados. O microquimerismo alogênico apresentou-se, significativamente, associado aos pacientes com menor incidência de episódios de rejeição aguda.

Com relação ao efeito das tipagens HLA e anticorpos anti-HLA no transplante de fígado, não foi confirmado nenhum efeito adverso de ambos os fatores, porém os pacientes com maior número de desigualdades HLA apresentaram uma menor incidência de rejeição aguda. Entretanto, foi constatado um possível efeito adverso no grupo de pacientes portadores de gene HLA-DRB1*15011 e um efeito benéfico relacionado ao prolongamento de tempo de sobrevida nos pacientes do sexo masculino.

Nossos resultados sugerem uma investigação mais precisa em uma grande população de pacientes para uma futura compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao microquimerismo e desigualdades HLA. Os dados da presente população estudada ainda sugerem a análise do microquimerismo e tipagem HLA nos pacientes após transplante de fígado alogênico com valor o preditivo no risco individual de cada paciente.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCOLLA, R.S.; AUFRAY, C.; SINGER, D.S.; GUARDIOLA, J. The molecular biology of MHC genes. **Immunology Today**, 12: 97-99, 1991
- ADAMS, P.W.; LEE H.S.; FERGUSON R.M.; OROSZ, C.G. Alloantigenicity of human endothelial cells. Analysis of interleukin 2 production by T cells after contact with allogeneic endothelia. **Transplantation**, 57: 115-122, 1994.
- ASIEDU, C.; MENG, Y.; WANG, W.; HUANG, Z.; CONTRERAS, J.L.; GEORGE, J.F.; THOMAS, J.M. Immunoregulatory role of CD8 alpha in the veto effect. **Transplantation**, 67: 372-380, 1999.
- BARBER, W.H.; MANKIN, J.A.; LASKOW, D.A.; DEIERHOI, M.H.; JULIAN, B.A.; CURTIS, J.J.; DIETHELM, A.G. Long-term results of a controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. **Transplantation** 51: 70-75, 1991.
- BARHGATE, A.J.; McCOLL, M.; GARDEN, O.J.; FORSYTHE, J.L.; MADHAVAN, K.K.; HAYES, P.C. The effect of a positive T-lymphocytotoxic cross-match on hepatic allograft survival and rejection. **Liver Transpl Surg**, 4: 280-284, 1998.
- BARTA, A.; BÁTAI, A.; KELEMEN, A.; LENGYEL, L.; REMÉNYI, P.; SIPOS, A. et al. Immunological importance of chimerism in transplantation: New conditioning protocol in BMT and the development of chimeric state. **Humam Immunology**, 61: 101-110, 2000.
- BEIN, G.; GLÄSER, R.; KIRCHNER, H. Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. **Tissue Antigens**, 39: 68-73, 1992.
- BELLI, L.S.; ZAVAGLIA, C.; ALBERTI, A.B.; et al. Influence of immunogenetic background on the outcome of recurrent hepatitis C after liver transplantation. **Hepatology**, 31(6): 1345, 2000.
- BELLINGHAM, R.E. The passenger cell concept in transplantation. **Cellular Immunology**, 1: 1-12, 1971.
- BERLAKOVICH, G.A.; IMHOF, M.; KARNER-HANUSCH, J. et al. The importance of the effect of underlying disease on rejection outcomes following liver transplantation. **Transplantation**, 61: 554-560, 1996.

- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROT, R.E.; CHARRON, D. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. **Tissue Antigens**, 49: 297-321, 1997.
- BRENT, L. Pathogenic role of delayed hypersensitivity and antibody in allograft reactions: cellular interactions in the immune response. 2nd International Convoc. **Immunology**. Basel: Karger, 250, 1970.
- BUSUTTIL, R.W.; McDIARMID S.; KLINTMALM, G.B. et al. A comparison of tacrolimus and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. **N Engl J Med** 331: 1110-1115, 1994.
- CALNE, R.Y.; SELLS, R.A.; PENA, J.R.; DAVIS, D.R.; MILLARD, P.R.; HERBERTSON, B.M.; BINNS, R.M.; DAVIES, D. A. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. **Nature**, 223: 472-476, 1969.
- CANDINAS, D.; GUNSON, B.K.; NIGHTINGALE, P.; et al. Sex mismatch as a risk factor for chronic rejection of liver allografts. **Lancet**, 346: 1117-1121, 1995.
- CICCONE, E.; MORETTA, A.; MORETTA L. Specific functions of human NK cells. **Immunol Lett**. 31: 99-103, 1992.
- CHARLTON, B.; ANCHINCLOSS, H.; FATHMAN, C.G. Mechanisms of transplantation tolerance. **Annu Rev Immunol**, 12: 707-734, 1994.
- CHICZ, R.M.; URBAN, R.G.; LANE, W.S. et al. Predominantly naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. **Nature**, 358: 764-768, 1992.
- COHN, M.; BLOMBERG, B. The self-nonself discrimination: a one- or two-signal mechanism? **Scand J Immunol**, 4 (1): 1-24, 1975.
- COLOVAL, A.I.; MOLAJONI, E.R.; CORTESINI, R.; SUCIU-FOCA, N. New approaches to specific immunomodulation in transplant. **Int Rev Immunol**, 13(3): 161-172, 1996.
- CRESPO-LEIRO, M.G.; HERMIDA-PRIETO, M.; RODRIGUES, J.A.; MUÑIZ, J.; BARRAL, S.; PANIAGUA, et al. Microchimerism after heart transplantation: prevalence, predisposing factors, natural history and prognosis, **Transplantation Proceedings**, 34: 161-163, 2002.

- CRESSWELL, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. **Annu Rev Immunol**, 12:259-293, 1994.
- DALLMAN, M.J.; WOOD, K.J.; HAMANO, K.; BUSHELL, A.R.; MORRIS, P.J.; WOOD, M.J.; CHARLTON, H.M. Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. **Immunol Rev**, 133: 5-18, 1993.
- DEMETRIS, A.J.; LASKY, S.; THIEL, D.H.V. Induction of DR/IA antigens in human liver allografts: An immunocytochemical and clinicopathological analysis of twenty failed grafts. **Transplantation**, 40: 504-509, 1985.
- DEMETRIS, A.J.; MARKUS, B.H. Immunopathology of liver transplantation. **Critical Reviews in Immunology**, 9: 67-92, 1989.
- DEMETRIS, A.J.; QUIAN S.; SUN E.A. Early events in liver allograft rejection: delineation of sites of simultaneous intragraft and recipient lymphoid tissue sensitization. **Am J Pathol**, 138: 609, 1991.
- DEMETRIS, A.; NAKAMURA, K.; YAGIHASHI, A.; IWAKI, Y.; TAKAYA, S.; HARTMAN, G.G. et al. A clinicopathological study of human liver allograft recipients harboring preformed IgG lymphocytotoxic antibodies. **Hepatology**, 16: 671-681, 1992.
- DEMETRIS, A.J.; BATTS K.P.; DHILLON A.P. et al. Banff scheme for grading liver allograft rejection: an international consensus document. **Hepatology**, 25: 658-663, 1997.
- DEVLIN, J.; O'GRADY, J.G.; TAN, K.C. Ethnic variations in patient and graft liver transplantation: identification of a new risk factor for chronic allograft rejection. **Transplantation**, 56: 1381-1384, 1998.
- DONALDSON, P.; WILLIAMS, R. Crossmatching in liver transplantation. **Transplantation**, 63: 789, 1997.
- DONNELLY, J.J.; ULMER, J.B.; SHIVER, J.W.; LIU, M.A. DNA vaccines. **Annu Rev Immunol**, 15: 617, 1997.
- DORAN, T.J.; GECZY, A.F.; PAINTER, D.; MCCAUGHAN, G.; SHEIL, A.G.; SUSAL, C.; OPELZ, G. A large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. **Transplantation**, 69(7): 1491-1498, 2000.

DUQUESNOY, R.J. Is there hyperacute rejection of the liver? **Transplants Proceedings**, 21: 3506 – 3507, 1989.

EGUCHI, S.; ROZGA, J.; LEBOW, L.T.; CHEN, S.C.; WANG, C.C.; ROSENTHAL, R.; FOGGI, L.; HEWITT, W.R.; MIDDLETON, Y.; DEMETRIOU, A.A. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. **Transplantation**, 62: 588-593, 1996.

ECKELS, D.D.; WANG, H.; BIAN, T.H.; TABATABAI, N.; GILL, J.C. Immunobiology of hepatitis C virus infection: the role of CD4 T-cells in HCV infection. **Immunol Rev** 174:90, 2000.

ELWOOD, E.T.; LARSEN, C.P.; MAURER, D.H.; ROUTENBERG, K.L.; NEYLAN, J. F.; WHELCHER, et al. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. **Lancet**, 349: 1358-1360, 1997.

FALTK, K.; RÖTZSCHKE, O.; STEVANOVIC, S.; JANG, G.; RAMMENSEE, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. **Nature**, 351: 290-296, 1991.

FARGES, O; ALIBA, F.; FARHAMANT H. et al. Incidence of rejection after liver transplantation as a function of primary disease-possible influence of alcohol and polyclonal immunoglobulins. **Hepatology**, 61: 554-560, 1996.

FERRAND, C.; PERRUCHE, S.; ROBINET, E.; MARTENS, A.; TIBERGHIE, P.; SAAS, P. How should chimerism be decoded? **Transplantation**, 75: 50S-54S, 2003.

FORBES, R.D.; PARFREY N.A.; GOMERSAIL, M. Dendritic cell-lymphoid aggregation and major histocompatibility antigen expression during rat cardiac allograft rejection. **J Exp Med**, 164: 1239-1258, 1986.

FUNG, J.J.; ZEEVI, A., STARZL, T.E.; DEMETRIS, A.J; IWATSUKI, S.; DUQUESNOY, R.J. Functional characterization of infiltrating T lymphocytes in human hepatic allografts. **Human Immunology**, 16: 182-199, 1986.

GARCIA, K.C.; DEGENO, M.; STANFIELD, R.L.; et al. An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5 angstroms and its orientation in the TCR-MHC complex. **Science**, 274: 209-219, 1996.

- GARNIER, H.; CLOT, J.P.; BERTRAND, M.; CAMPLEZ, P.; KUNLIN, A.; GORIN, J.P.; LE GOAZIOU, F.; LEVY, R.; CORDIER, G. Liver transplantation in the pig: surgical approach. *C R Acad Sci hebd Seances Acad Sci D.*, 24;260(21): 5621-5623, 1965.
- GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. Patologia do fígado transplantado. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. Atheneu, 2001. p. 1219-1235.
- GEORGE, J. F.; SWEENEY, S.D.; KIRKLIN, J.K.; SIMPSON, E.M.; GOLDSTEIN, D. R.; THOMAS, J.M. An essential role for ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow. *Nat Med*, 4: 333-335, 1998.
- GORDON, R.D.; IWATSUK, S.; ESQUIVEL, C.O; TZAKIS, A.; STARZL, T.E. Liver Transplantation Across ABO blood Groups. *Surgery*, 100: 342-348, 1986b.
- GORER, P.A. Genetic and Antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.*, 44: 691-697.
- GOUW, A.S.H.; HOUTHOFF, H.J.; HUITEMA, S. et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation*, 43: 291-296, 1987.
- GUNSON, B.K.; HATHAWAY, M.; BUCKELS, J.C.A.; et al. HLA matching in liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation Proceedings*, 24: 324, 1992.
- HARGREAVES, R.G.; BORTHWICK N.J.; MONTANI M.S.; PICCOLELLA E.; CARMICHAEL P.; LECHLER, R.I. Induction of apoptosis following antigen presentation by T cells: anergy and apoptosis are two separate phenomena. *Transplant Proc.* 29(1-2): 1102-1104, 1997.
- HISANAGA, M.; HUNDRIESER, J.; BÖKER, K.; UTHOFF, K.; RADDATAZ, G.; WAHLERS, T.; WONIGEIT, K.; PICHLMAYR, R.; SCHLITT, H.J. Development Stability and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation*, 61: 40-45, 1996.
- HISANAGA, M.; HUNDRIESER, J.; BOKER, K.; UTHOFF, K.; RADDATZ, G.; WAHLERS, T.; WONIGEIT, K. et al. Development, stability, and clinical correlation of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation*, 61: 40-45, 1996a.

- HISANAGA, M.; SCHLITT, H.J.; HUNDRIESER, J.; WONIGEIT, K.; NAKAJIMA, Y.; KANEHIRO, H.; PICHLMAYR, R. Frequency and clinical correlations of allogeneic microchimerism after heart, liver, and lung transplantation. **Transplantation Proceedings**, 29: 1215-1217, 1997.
- HOLLSBERG, P.; BATRA, V.; DRESSEL, A; HAFLER, D. A. KHAN A.; TOMITA, Y.; SYKES, M. Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. **J Immunol**, 157: 5269-5276, 1996.
- HÜBSCHER S.G.; ADAMS D.H.; ELIAS E. Changes in the expression of NHC class II antigens in liver allograft rejection. **J Pathol**, 22: 1828-1829, 1990.
- HURLEY, C.K. Acquisito and use of DNA based HLA typing data in bone marrow registries. **Tissue Antigens**, 49: 323-8, 1997.
- IBRAHIM, S.; DAWSON D.V.; KILLENBURG P.G.; SANFILIPPOF. The pattern and phenotype of T-cell infiltration associated with human liver allograft rejection. **Human Pathol**, 24: 1365- 1370, 1993.
- International Working Panel. Terminology for hepatic allograft rejection. **Hepatology**, 22: 648-54, 1995.
- JOSEPH, J.M.; MOSIMANN, F.; TIERCY, J.M.; ROUX, E.; CEROTTINI, J.P.; GILLET, M., et al. PCR confirmation of microchimerism and diagnosis of graft versus host disease after liver transplantation, **Transplant Int**, 12: 468-470, 1999.
- KAMADA, N.; DAVIES, H.F.S.; ROSER, B. Reversal of transplant immunity by liver grafting. **Nature**, 292: 840-842, 1981.
- KHAN, A.; TOMITA Y.; SYKES M. Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic chimeras after depletion of donor antigen. **Transplantation**, 62: 380-387, 1996.
- KISSEMEYER-NIELSEN, F.; OLSEN, S.; PETERSON, V.P.; FJELDBORG, O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. **Lancet**, 2: 662-665, 1966.
- KLINTMALM, G.B.G.; ALEXANDER, G.J.M.; SUTHERLAND, S. Rejection in liver transplantation. **Hepatology**, 10: 978-985, 1989.

- KNECHTLE, S.J.; KALAYOLU, M.; D'ALESSANDRO, A.M.; et al. Histocompatibility and liver transplantation. *Surgery*, 114: 667, 1993.
- KNOOP, C.; ANDRIEN, M.; DEFLEUR, V.; ANTONINE, M.; DE FRANQUEN, P.; GOLDMAN, M.; ESTENNE, M. Detection of blood chimerism after lung and heart-lung transplantation. *Transplantation*, 58: 1335-1338, 1994.
- KO, S.; DEIWICH, A.; JAGER, M. D.; DINKEL, A.; ROHDE, F.; FISCHER, R.; TSUI, T. Y.; RITTMANN, K. L.; WONIGEIT, K.; SCHLITT, H. J. The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med*, 5: 1292-1297, 1999.
- KREIGER, N.R.; YIN, D.P.; FARTHMAN, C.G. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *Journal of Experimental Medicine*, 184: 2013, 1996.
- KYUNG-SUK, S.; SANG, B.K.; SEONG-HWAN, C.; SEONG, H.K.; KYUNG, W.M.; MYOUNG, H.P.; KYOU, S.H.; KUHN, U.L. Significance of positive cytotoxic cross-match in adult-to-adult living donor liver transplantation using small graft volume. *Liver Transplantation*, 8(12): 1109-1113, 2002.
- LAMBERT, N.; NELSON, L., Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmunity Reviews*, 2003.
- LARSEN, C.P.; MORRIS, P.; AUSYTN, J.M. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 171: 307-314, 1990.
- LECHLER, R.I.; BATCHELOR J.R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 155: 31-41, 1982.
- LOHSE, A.W.; KNOLLE, P.A.; BILO, K.; UHRIG, A.; WALDMANN, C.; IBE, M.; SCHMITT, E.; GERKEN, G.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology*, 110: 1175-1181, 1996.
- LOMBARDI, G.; HARGREAVES, R.; SIDHU, S.; IMAMI, N.; LIGHT-STONE, L.; FULLER-ESPIE, S.; RITTER, M.; ROBINSON, P.; TARNOK, A.; LECHLER, R. Antigen presentation by T cells inhibits IL-2 production and induces IL-4 release due to altered cognate signals. *J Immunol*, 156: 2769-2775, 1996.

LU, L.; BONHAM, C.A.; LIANG, X.; CHEN, Z.; LI, W.; WANG, L.; WATKINS, S.C.; NALESNIK, M. A.; SCHLISSEL, M.S.; DEMESTRIS, A. J.; FUNG, J.J.; QIAN, S. Liver-derived DEC205⁺-B220⁺CD19⁻ dendritic cells regulate T cell responses. **J Immunol**, 166: 7042-7052, 2001.

LUDWIG, J. Classification and terminology of hepatic allograft rejection: whither bound? **Mayo Clinic Proceedings**, 64: 676-679, 1989.

LUDWIG, J. Terminology of hepatic allograft rejection. **Semin Liver Dis**, 12: 89-92, 1992.

LUDWIG, J. Terminology of chronic hepatitis, hepatic allograft rejection, and nodular lesions of the liver: summary of recommendations developed by an international working party, supported by the World Congress of Gastrology, Los Angeles. **American Journal of Gastroenterology**, 89: S177-S181, 1994.

MARKUS, B.N.; DEMESTRIS, A. J.; SADMANN, S. Alloreactive T lymphocytes cultured from liver transplantation of HLA specificity with clinicopathological findings. **Clin Transplant**, 2: 70-75, 1988a.

MARKUS, B.H.; DUQUESNOY, R.J.; GORDON, R.D. et al. Histocompatibility and liver transplant outcome: Does HLA exert a dualistic effect? **Transplantation**, 46(3): 372, 1988b.

McDANIEL, H.B.; YANG, M.; SIDNER, R.A.; JINDAL, R.M.; SAHOTA, A. Prospective study of microchimerism in transplant recipients. **Clin Transplant**, 13(2): 187-192, 1999.

McDONALD, J. C.; ADAMASHVILI, I.; HAYES, J. M.; AULTMAN, D. F.; RHYNES, V.K.; GELDER, F. B. Soluble HLA class II concentrations in normal individuals and transplant recipients. Comparison with soluble HLA class I concentrations. **Transplantation**, 58: 1268-1272, 1994.

McKENNA, R.M.; TAKEMOTO, S.K.; TERASAKI, P.I. Anti-HLA Antibodies Solid Organ Transplantation. **Transplantation**, 69: 319-326, 2000.

McSHERRY, C.; JACKSON, A.; HERTZ, M.I.; BOLMAN, R.M. 3rd.; SAVIK, K.; REINSMOEN, N.L. Sequential measurement of peripheral blood allogeneic microchimerism levels and association with pulmonary function. **Transplantation**, 62: 1811-1818, 1996.

- MONACO, A.P.; MEDAWAR, P. Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. **Transplantation**, 75: 13S-16S, 2003.
- MONACO, J.J. Major histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. **Immunological Research**, 11: 125-132, 1992.
- MONEZ, R.; WHILE, L.T.; LINDEN, P.; et al. The influence of HLA matching on cytomegalovirus, hepatitis and chronic rejection after liver transplantation. **Transplantation**, 55: 1067, 1993.
- MOORE, F.D.; WHEELER, H.B.; DEMISSIANOS, H.V. One-stage homotransplantations of the liver following total hepatectomy in dogs. **Transplant Bulletin**, 6: 103-106, 1959.
- MORGAN, C.J.; HERNANDEZ, C.J.; WARD, J.S. ET AL. Detection of cytokine mRNA in vivo by polymerase chain reaction. **Transplantation**, 56: 437, 1993.
- MOYA-QUILES, M.R.; TORIO, A.; MURO, M.; MONTES-ARES, O.; MARIN, L.; MINGUELA, A.; SANCHEZ-BUENO, F.; GARCIA-ALONSO, A.M.; PARRILLA, P.; ÁLVAREZ-LÓPEZ, M.R. Impact of HLA-C on acute rejection in liver transplantation. **Transplantation Proceedings**, 35: 1892-1893, 2003.
- MULLER, C.A.; HASMANN, R.; GROSSE WILDE H. et al. Significant association of acute lymphoblastic leukemia with HLA-Cw7. **Genetic Epidemiology**, 5: 453-461, 1988.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, 155: 335, 1987.
- MURASE, N.; YE, Q.; SAKAMOTO, T.; TERAURA, M.; DEMETRIS, A.J.; THOMSON, A .W.; RAO, A; STARZL, T.E. Effect in supralethally irradiated rats of granulocyte colony-stimulating factor and lisofylline on hematopoietic reconstitution by syngeneic bone marrow or whole organ passenger leukocytes. **Transplantation**, 63: 1840-1843, 1997.
- NEUHAUS, P.; PICHLMAYR R. et al. Randomized trial comparing tacrolimus and cyclosporin for immunosuppression in prevention of liver allograft rejection. **Lancet**, 344: 423-428, 1994.
- NEUMANN, U.P.; GUCKELBERGER, O.; LANGREHR, J.M.; LANG, M.; SCHMITZ, V.; THERUVATH, T.; SCHONEMANN, C.; MENZEL, S.; KLUPP, J.; NEUHAUS, P. Impact of human leukocyte antigen matching in liver transplantation. **Transplantation**, 75: 132-137, 2003.

- NIKAEIN, A.; BACKMAN, L.; JENNINGS, L.; LEVY, M.F.; GOLDSTEIN, R.; GONWA, T.; STONE, M.J.; KLINTMAL, M. Improved Patient Survival by HLA and Cross-Matching. **Transplantation**, 58: 786-792, 1994.
- NORRIS, S.; LAWLER, M.; McCANN, S.; HEGARTY, J.; O'FARRELLY, C. Donor type microquimerism is na infrequent event following liver transplantation and is not associated with graft acceptance. **Hepatology**, 26: 848-852, 1997.
- O'CONNELL, P.J.; MORELLI, A.E.; LOOGAR, A.J.; THOMSON, A.W. Phenotypic and Functional Characterization of Mouse Hepatic CD8 alpha+lymphoid-related dendritic cells. **J Immunol**, 165: 795-803, 2000.
- O'GRADY J.G.; ALEXANDER G.J.M.; SUTHERLAND S. Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile duct syndrome after liver transplantation. **Lancet**, 2: 302-305, 1988.
- OLERUP, O. & ZETTERQUIST, H. Identification of the HLA-DRB*04, -DRB1*07, and -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. **Human Immunology**, 34: 64-74, 1992.
- OPELZ G.; WUJCIAK T.; DOHLER B.; SCHERER S.; MYTILINEOS J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. **Rev Immunogenet**, 1(3): 334-342, 1999.
- OTA, H.; GOTOH, M.; OHZATO, G.; DONO, K.; TAKEDA, Y.; UMESHITA, K.; SAKON, M.; NISHISHO, I.; MONDEN, M. Microchimerism and hyporesponsiveness induced by intraportal injection of donor spleen cells in rats. **Cell Transplant**, 6: 551-552, 1997.
- OWEN, R.D. Immunologic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. **Science**. 102: 400-401, 1945.
- PARHAM, P.; LOMEN, C.E.; LAWLOR, D.A.; WAYS, J.P.; HOLMES, N; COPPIN, H.L.; SALTER, R.D.; WAN, A.M.; ENNIS, P.D. Nature of polymorphism in HLA-A,-B,-C molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 85: 4005-4009, 1988.
- PARHAM, P.; OHTA, T. Population biology of antigen presentation by MHC Class I molecules. **Science** 272: 67-74, 1996.

- PATEL, R.; TERASAKI, P.I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **N Engl J Med**, 280(4): 735, 1969.
- POTTER, T.A.; RAJAN, T.V.; DICK, I.I.R.F.; BLUESTONE, J.A. Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, 337: 73-75, 1989.
- RADDATZ, G.; DEIWICK, A.; SATO, T.; SCHLITT, H.J. Inhibition of cytotoxic alloreactivity by human allogeneic mononuclear cells: evidence for veto function of CD2+ cells. **Immunology**, 94: 101-108, 1998.
- RAMMENSEE, H. G. Veto function in vitro and in vivo. **Int Rev Immunol**, 4: 175-191, 1989.
- RICHTER, N.; RADDATZ, G.; GRAETER, T.; SCHAFERS, H.J.; SCHLITT, H. J. Allogeneic lymphocyte chimerism after clinical lung transplantation. **Transplant Immunol**, 3: 74-80, 1995.
- RICHTER, N.; RADDATZ, G.; STEINHOFF G.; SCHÄFERS, H. J.; SCHLITT, H. J. Transmission of donor lymphocytes in clinical lung transplantation. **Transplant Int**, 7: 414-419, 1994.
- ROLLES, K.; BURROUGHS, A.K.; DAVIDSON, B.R.; KARATAPANIS, S.; PRENTICE, H.G.; HOMON, M.D. Donor-specific bone marrow infusion after orthotopic liver transplantation. **Lancet** 343: 263-265, 1994.
- ROOD, J.J. van LEEUWEN; A. Van; FERNISSE, J.G. The Eurotransplant story. In **History of transplantation: Thirty-Five Recollections** (ed. P.I. Terasaki), pp. 497-510, 1991.
- ROSENBERG, A.S. The T cell population mediating rejection of MHC class I disparate skin grafts in mice. **Transplant Immunology** 2: 93-99, 1993.
- ROTZSCHKE, O.; FALK, K.; FAATH, S.; RAMMENSEE, H.G. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. **Journal of Experimental Medicine**, 174: 1059-1071, 1991.
- RUBOCKI, R.; LANGNAS, A.; SHEPHERD, S.; DEGENHARDT, J.; CATTRAL, M.; SHAW, B.; WISECARVER, J. The origin of lymphocytes in donor-derived lymph nodes following combined liver and small bowel transplantation. **Transplantation**, 57: 303-306, 1994.

RUDENSKY, A.Y.; PRESTON-HURLBURT, P.; AL-RAMADI, B.K.; ROTHBARD, J.; JANEWAY, C.A. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature*, 359: 429-431, 1992.

RUDERT, W.A.; KOCOVA, M.; RAO, M.; TRUCCO, M. Fine quantification by competitive PCR of circulating donor cells in posttransplant chimeric recipients. *Transplantation*, 58: 964-965, 1994.

SAHOTA, A.; YANG, M.; McDANIEL, H.B.; SIDNER, R.A.; BOOK, B.; BARR, R.; BRAHMI, Z.; JINDAL, R.M. Evaluation of seven PCR-based assays for the analysis of microchimerism. *Clin Biochem*, 31: 641-5, 1998.

SAIDMAN, S.L.; DEMETRIS, A.J.; ZEEVI, DUQUENOY, R.J. Propagation of lymphocytes infiltrating human liver allografts, correlation with histologic diagnosis of rejection. *Transplantation*, 49: 107, 1990.

SATO, T.; DEIWICK, A.; RADDATZ, G.; KOYAMA, K.; SCHLITT, H. J. Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin. *Clin Exp Immunol*, 115: 301-308, 1999.

SAWYER, R.G.; PELLETIER, S.J.; SPENCER, C.E.; et al. Increased late hepatic artery thrombosis rate and decreased graft survival after transplants with zero cross-reactive group mismatches. *Liver Transpl*, 6(2): 229, 2000.

SCHARF, S.; SAIKI, R.; ERLICH, H. New methodology for HLA class II oligonucleotide typing using polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Hum Immunol*, 23: 143, 1989.

SCHLITT, H. J.; NASHAN B.; KICK P.; RINGE B.; WITTEKIND C.; WONIGEIT K.; PICHLMAYR R. Intragraft immune events after human liver transplant. Correlation with clinical signs of acute rejection and influence of immunosuppression. *Transplantation*, 54: 273-278, 1992

SCHLITT, H. J.; KANEHIRO, H.; RADDATZ, G.; STEINHOFF, G.; RICHTER, N.; NASHANM, B. et al. Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. *Transplantation*, 56: 1001-1007, 1993.

- SCHLITT, H.J.; KANEHIRO, J.; RADDATZ, G.; STEINHOFF, G.; RICHTER, N.; NASHAN, B. et al. Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. **Transplantation**, 56: 1001-1007, 1993a.
- SCHLITT, H.J.; RADDATZ, G.; STEINHOFF, G.; WONIGEIT, K.; PICHLMAYR, R. Passenger lymphocytes in human liver allografts and their potential role after transplantation. **Transplantation**, 56: 951-955, 1993b.
- SCHLITT, H.J.; HUNDRIESER, J.; HISANAGA, M.; UTHOFF, K.; KARCK, M.; WAHLERS, T. et al. Patterns of donor-type microchimerism after heart transplantation. **Lancet**, 343: 1469-1471, 1994a.
- SCHLITT, H.J.; HUNDRIESER, J.; RINGE, B.; PICHLMAYR, R. Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. **N Engl J Med**, 330: 646-647, 1994b.
- SCHLITT, H.J.; TISCHLER, H.J.; RINGE, B.; RADDATZ, G.; MASCHEK, H.; DIETRICH, H. et al. Allogeneic liver transplantation for hepatic veno-clinical and immunological considerations. **Bone Marrow Transplant**, 16: 473-478, 1995.
- SCHWARTZ, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science** 248, 1349-1356, 1990.
- SEABERG E.C.; BELLE S.H.; BERINGER K.C., et al. Long-term patient and retransplantation survival by selected recipient and donor characteristics: an update from the Pitt-UNOS liver transplant registry. **ClinTransplant**, 18: 15-28, 1997.
- SHER, L.S.; COSENZA, C.A.; MICHEL et al. Efficacy of tacrolimus as rescue therapy for chronic rejection in orthotopic liver transplantation: a report of the US Multicentre Liver study Group. **Transplantation**, 64: 258-263, 1997.
- SPRIEWALD, B.M.; WASSMUTH, R.; CARL, H.D.; KÖCKERLING, F.; REICHSTETTER, S.; KLEEBERGER, A. et al. Microchimerism after liver transplantation – prevalence and methodological aspects of detection, **Transplantation**, vol. 66 Jul, 77-83, 1998.
- STARZL, T.E.; MACHIORO, T.L.; VON KAULLA, K. et al. Homo transplantation of the liver in humans. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, 177: 659-676, 1963.

- STARZL, T.E. Experiences in Hepatic Transplantation of the liver in humans. **W.B. Saunders, Philadelphia**, 1969.
- STARZL, T.E.; DEMETRIS A.J.; MURASE, N.; ILDESTAD, S.; RICORDI, C.; TRUCCO, M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. **Lancet**, 339: 1579-1582, 1992a.
- STARZL, T.E.; DEMETRIS A.J.; TRUCCO, M.; RAMOS, H.; ZEEVI, A.; RUDERT, W.A.; KOCOVA, M. et al. Systemic chimerism in female recipients of male livers. **Lancet**, 340: 876-877, 1992b.
- STARZL, T.E.; DEMETRIS A.J.; MURASE, N.; THOMSON, A.W.; TRUCCO, M.; RICORDI, C. Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation. **Immunol Today**, 14: 326-332, 1993a.
- STARZL, T.E.; DEMETRIS A.J.; TRUCCO, M.; MURASE, N.; RICORDI, C.; ILDESTAD, S.; RAMOS, H. et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. **Hepatology**, 17: 1127-1152, 1993b.
- STARZL, T.E.; ZINKERNAGEL, R. M. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. **N Engl J Med**, 339: 1905-1913, 1998.
- STEINHOFF G.; WONIGEIT K.; PICHLMAYR R. Analysis of sequential changes in histocompatibility complex expression in human liver grafts after Transplantation. **Transplantation**, 45: 394-401, 1988.
- STEINMAN, R.M.; Witmer, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** 75, 5132-5136, 1978.
- STROBER, S.; BENIKE, C.; SHALINI, K.; ENGLEMAN, E.G.; GRUMET F.C., Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: Studies of chimerism and anti-donor reactivity. **Transplantation**, 69: 1549-1554, 2000.
- SUBERBIE, C.; CALLIAT-ZUCMAN, S. LEGENDRE C., BODEMER C, NOEL LH, KREIS, H...BACH, J F. Peripheral microchimerism in long-term cadaveric- kidney allograft recipient. **Lancet** 343: 1468-1469, 1994.

SUN, J.H.; McCAUGHAN, G.W.; GALLAGHER, N.D.; SHEIL, A.G.R.; BISHOP, G.A. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. **Transplantation**, 60(3): 233-236, 1997.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, 43: 18-27, 1994.

TAKAYA, S.; BRONSTHER, O.; IWAKI, Y, NAKAMURA, K.; ABU-ELMAGD, K.; YAGIHASHI, A.; et al. The adverse impact on liver transplantation using positive cytotoxic crossmatch donors. **Transplantation**, 53: 400-406, 1992.

TAUROG, J.D.; EL-ZAATARI, A.K. In vitro mutagenesis of HLA-B27. Substitution of unpaired cysteine residue in the $\alpha 1$ domain causes loss of antibody defined epitopes. **Journal of Clinical Investigations**, 82: 987-992, 1988

TERASAKI, P.I.; McCLEND, J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, 204: 998-1000, 1964.

TERASAKI, P.I.; McCLEND, J.; PARK, M.S. & McCURLY, B. Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. "In": RAY, J.G.; HARE, D.B.; PEDERSEN, P.D. & KAYOE, D.E. ed. Manual of tissue typing techniques. NIH. **Bethesda**, 66-72, 1974.

THEISE N.D.; NIMMAKAYALU M.; GARDNER R.; ILLEI P.B.; MORGAN G.; TEPERMAN L. et al. Liver from bone marrow in humans. **Hepatology** 32: 11-16, 2000.

THOMAS, J.; CARVER, M.; CUNNINGHAM, P.; PARK, H.; GONDER, J.; THOMAS, F. Promotion of incompatible allograft acceptance in rhesus monkeys given post-transplant antithymocyte globulin and donor bone marrow. In vivo parameters and immunohistologic evidence suggesting microchimerism. **Transplantation**, 43: 332-338, 1987.

THOMAZ, E.M.; SAKAMOTO, A.M.; DONADI, E.A.; MAGNA, L.A.; KRAEMER, M.H.S. Molecular analysis and distribution of the MHC class II alleles and haplotypes in the Brazilian Population. International Proceeding Division, Bologna, vol.II, p169-172, 1998.

THOMSON, A.W.; DRAKES, M. L.; ZAHORCHAK AF. O'CONNELL, P.J.; STEPTOE, R. J.; QIAN S. LU, L. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. **J Leukoc Biol**, 66: 322-330, 1999.

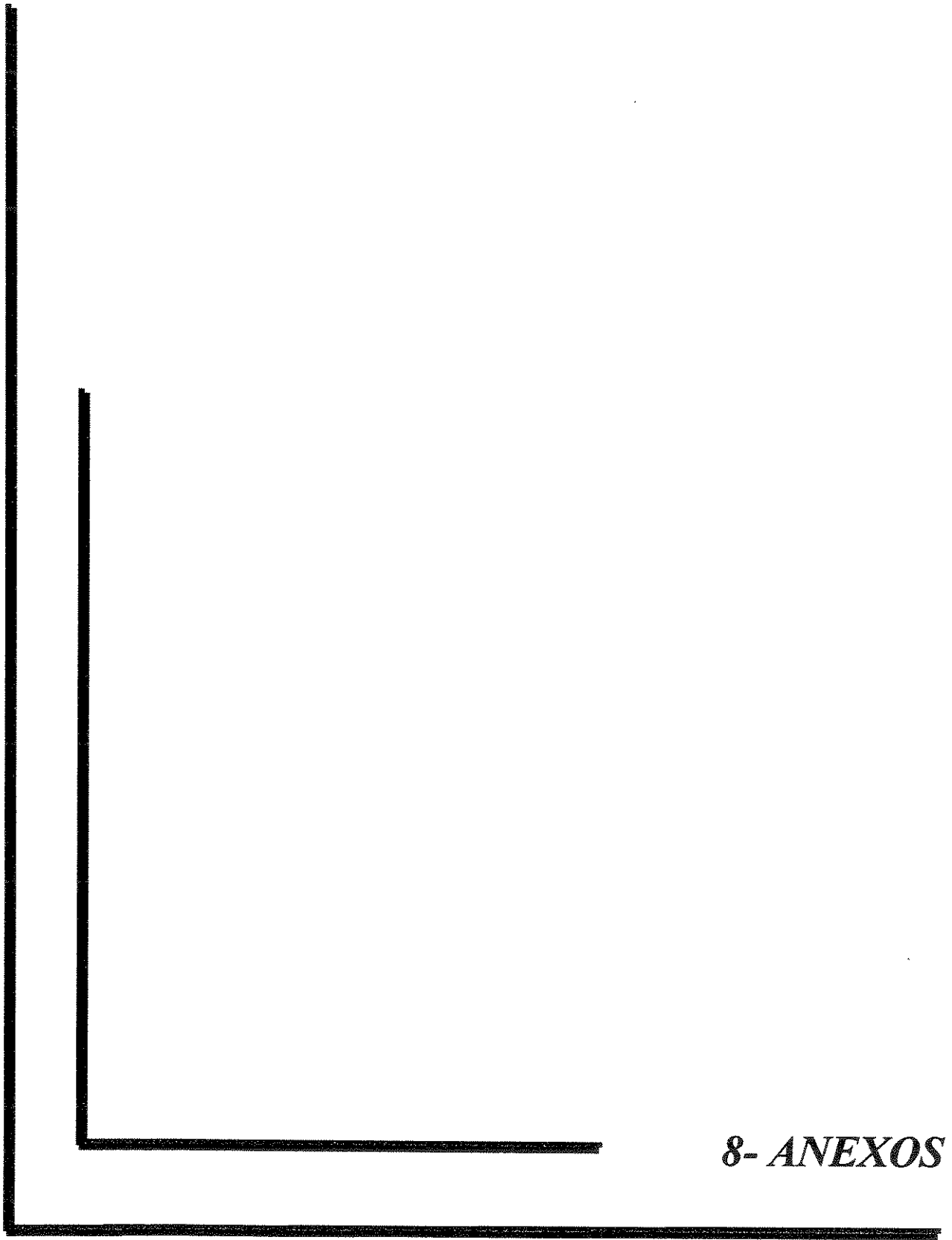
- TIPPNER C.; NASHAN B.; HOSHINO K.; SCHMIDT-SANDTE E.; AKIMARU K.; BÖKER K H W. ; SCHLITT H.J. Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: contributing factors and relevance for the long-term course. **Transplantation** 72: 1122-1128, 2001
- TOMITA, Y; KHAN, A; SYKES, M. Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. **J Immunol**, 153: 1087-1098, 1994.
- TROWSDALE, J.; RAGOISSIS, J.; CAMPBELL, R.D. Map of the human MHC. **Immunology Today**, 12: 445, 1991.
- TSUI, T.Y.; DEIWICK, A.; KO, S.; SCHLITT, H.J. Specific immunosuppression by postoperative infusion of allogeneic spleen cells: requirement of donor major histocompatibility complex expression and graft-versus-host reactivity. **Transplantation**, 69: 15-30, 2000.
- UEDA, M.; HUNDRIESER, J.; HISANAGA, M.; TANAKA, K.; WONIGEIT, K.; PICHLMAYR, R. et al. Development of microchimerism in pediatric patients after living-related liver transplantation. **Clin Transplant**, 11: 193-200, 1997.
- VAN ELS, C.A.C.M.; D-AMARO, J.; POOL, J. et al. Immunogenetics of human monor histocompatibility antigens: their polymorphisms and immunodominance. **Immunogenetics**, 35: 161-165, 1992.
- WANG, J.H.; LAYDEN, T.J.; ECKELS, D.D. Modulation of the peripheral T-cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. **Human Immunology**, 64: 662-673, 2003.
- WEKERLE, T.; SAYEGH, M. H.; ITO, H.; HILL, J.; CHANDRAKER, A.; PEARSON, D. A. et al. Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non-myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance. **Transplantation**, 68: 1348-1355, 1999.
- WIESNER R.H.; DEMETRIS A.J.; BELLE S.H., et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. **Hepatology** 3: 638-645, 1998.

WIGHT, D.G.D. Development, anatomy, physiology, patterns of injury. In: **Liver, Biliary Tract and Exocrine Pancreas**, Vol. 11 (ed. D.G.D. Wight), pp. 1-52. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994b.

WOOD, KJ.; SACHS, D.H. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. **Immunol Today**, 17: 584-587, 1996.

YAN, Y.; SHASTRY, S.; RICHARDS, C.; WANG, C.; BOWEN, D.G.; SHARLAND, A. F. et al. Posttransplant administration of donor leukocytes induces long-term acceptance of kidney or liver transplants by an activation-associated immune mechanism. **J Immunol**, 166: 5258-5264, 2001.

ZHU, F.; ECKELS, D.D. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8⁺/tetramer positive CTL. **Human Immunology**, 63: 710, 2002.



KEYS WORDS: LIVER TRANSPLANT, ALLOGENEIC MICROCHIMERISM, nested PCR, HLA- mismatch, organ rejection

DEVELOPMENT OF DONOR-SPECIFIC MICROCHIMERISM IN LIVER-TRANSPLANT RECIPIENT WITH HLA DRB1 AND DQB1 MISMATCH RELATED TO EPISODES OF REJECTION

M.B. Araújo¹, L.S. Leonardi², I.F.S.F. Boin², M.I. Leonardi², L.A. Magna³, E.A. Donadi⁴ and M.H.S. Kraemer¹.

ABSTRACT

Migration of donor-derived cells to recipient tissues after liver transplantation has proved to be a mechanism that induces and maintains allograft tolerance, although acute rejection remains an important issue, since it causes post-transplantation mortality and complications related to immunosuppressive therapy. We therefore determined either presence or absence of chimerism and examined both recipient and donor mismatch of HLA DRB1 and DQB1 alleles related to occurrence of rejection. Laboratorial analysis of peripheral blood was carried out before, as well as 10 days to 16 months after liver transplantation in 32 recipients using ganglion or spleen cell samples of respective donors. DNA was extracted of samples and HLA DRB1 and DQB1 alleles typing was obtained through polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP). Microchimerism was analyzed through nested PCR. Our results confirmed that patients with one or two mismatches of HLA-DRB1 and - DQB1 alleles did not show any significant mismatch ($p<.05$). Microchimerism was present in 71.88% of the patients, and its correlation to rejection demonstrated a significant association ($p<.05$). Results suggest that the presence of microchimerism can be associated with acceptance, tolerance and survival of the allograft.

¹Immunogenetics Transplant Laboratory – Clinical Pathology Department; ²Department of Surgery, ³Department of Genetics - School of Medical Science, Campinas, State of São Paulo, Brazil and ⁴Immunology Molecular Laboratory of the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto (FMRP-USP-SP), State of São Paulo, Brazil.

INTRODUCTION

Liver transplant is the best alternative in treatment of chronic or acute hepatic diseases in terminal phase^{1,2}, although the immunological factors in liver transplant are conflicting and inconclusive. Doran et Starzl^{3,4} demonstrated the persistence of donor cells in peripheral blood of recipients after hepatic transplantation, a phenomenon called microchimerism, which could be a mechanism that induces acceptance of the donor's specific allograft. Clinical experience of hepatic transplantation indicates chronic rejection as the main cause of the loss of the graft, and further shows that the tolerance acquired during the years after the transplantation can only be confirmed after interruption of immunosuppressor therapeutics, which entails its specific inherent risks⁵ and thus emphasizes the importance of analyzing the microchimerism phenomenon. Further, the influence of HLA mismatching on liver transplantation remains controversial.^{6,7} Consequently, the objectives of the present study were to detect, in recipients, occurrence of HLA-DRB1 alleles for nested PCR-SSP stemming from donors that characterizes allogeneic microchimerism and to assess HLA-DRB1 and -DQB1 alleles mismatch between recipient and donor associated to episodes of rejection.

PATIENTS AND METHODS

The group of patients consisted of 32 liver transplant patients and their respective donors, all aged between 15 and 65, and of both sexes. The basic diseases were Cirrhosis C Virus (n=20), Hepatitis Autoimmune (n=4), Cryptogenic Cirrhosis (n=1) e Alcoholic Cirrhosis (n=7), all of them found at the Clinical Hospital of the School of Medical Science, UNICAMP. Peripheral blood samples were obtained from patients before, and 10 days to 16 months after liver transplantation and ganglion or spleen cell samples were obtained from respective donors. A pre-transplant blood sample was collected from each patient to serve as an individual negative control.

HLA Typing - DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the "salting-out" method⁶ and class II typing was carried out by specific sequence primers (PCR-SSP) supplied by One Lambda, Inc. Ca, USA, at generic level I by typing at medium resolution. HLA-DRB1 alleles were determined by 13 primer mixes, -DRB3 by 3 primer mixes, -DRB4 by 1 primer mix, -DRB5 by 2 primer mixes and -DQB1 by 5 primer mixes. Reaction

of PCR was analyzed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Presence of the specific PCR product was visualized by a (UV) transilluminator and documented by photographs.

Nested-PCR-SSP Typing - Nested PCR/SSP methodology was carried out according to BEIN et al.⁹ to detect donor-specific HLA DRB1 alleles in patients after liver transplantation. Nested PCR consisted of two consecutive PCR assays. Generic amplification of the exon 2 of the DRB1 gene was carried out during the first assay; the resulting product of the first PCR was submitted to a new amplification in the second assay using specific primers of donor HLA-DRB1 allele. DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes of patients and from donor ganglions or spleens. For PCR, .5µg/µl of generic DNA was used in a 50µl reaction. Reaction mix consisted of 10 x PCR buffer, MgCl (50mM), 10mM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 10pmol of each 3' and 5' primer and .5µl of Taq polymerase. Amplification was carried out in 30 cycles. Each cycle consisted of denaturation at 95°C for 1 min., annealing at 53°C for 1 min., and extension at 72°C for 5 sec. All reactions were amplified on a thermocycler - Perkin Elmer - Gene Amp-PCR System 2,400. After confirmation of presence of generic PCR product by electrophoresis in agarose gel, this first-round PCR product was diluted 1:100 in sterile water and 5µl of this new solution was submitted to a second amplification with donor HLA alleles-specific primers. Amplification was carried out in 30 cycles. Each cycle consists of denaturation at 94°C for 20 sec., annealing at 60°C for 20 sec., and extension at 72°C for 40 sec. In both proceedings, reaction of PCR was analyzed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Presence of the specific PCR product was visualized by a (UV) transilluminator and documented by photographs.

Statistical Analysis - Statistical analysis of HLA alleles was carried out by means of X² square Chi test using Fisher's exact test. Statistical significance was given when p<.05 during assessment of microchimerism and mismatches of HLA alleles for rejection group versus non-rejection group.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the characteristics of patients, as well as those of recipient and donor HLA alleles. Figure 1, the donor-specific bands, shows detection of microchimerism. Figure 2 shows presence or absence of microchimerism associated to rejection. Our results show that 71.88% of the 32 examined patients presented microchimerism, of which 50% showed microchimerism without rejection, and 21.88% showed microchimerism with rejection. Therefore correlation with rejection demonstrated a significant association ($p < .05$) and those without microchimerism, either with or without rejection were respectively of 21.87% and 6.25%. These data indicate that microchimerism is frequently observed in peripheral blood up to 16 months after liver transplantation and that it can occur in the presence of rejection. The phenomenon of microchimerism seems to be related to long-term graft tolerance and the ability to establish a tolerance has been enhanced with current immunosuppressive drugs. The tolerance is not universally accepted and, in fact, is controversial at present. Two main categories of criticisms against this hypothesis are that 1) immunologic microchimerism does not exist in all functionally tolerant organ transplant recipients, and 2) microchimerism is a epiphenomenona that does not play a causative role in tolerance induction.¹⁰ Figures 3 and 4 show analysis of DRB1 and DQB1 alleles mismatches in recipient/donor pairs, when correlated with rejection. These were not statistically significant. Our analysis demonstrated that 59.4% of the patients showed 1 mismatch and 40.6% showed 2 mismatches regarding DRB1 alleles. Regarding DQB1 alleles, 12.5% were identical, 50% showed 1 mismatch, and 37.5% showed 2 mismatches; rejection rate up to two months after transplantation was 43.75%. These data suggest that without rejection, HLA mismatches do not cause any impact. However, some studies mention the negative effect of HLA mismatches on survival of allograft^{11,12}. Some authors have proposed a dualistic role of HLA: HLA matching may reduce the incidence of acute rejection on one hand, and on the other hand, it could increase the recurrence of liver diseases after transplantation.¹¹

In conclusion, our results suggest that the HLA DRB1 and DQB1 mismatches do not have any influence on rejection and that the presence of microchimerism does not depend on these. Further, the presence of microchimerism can be associated to graft tolerance and that donor cells can be detected in peripheral blood of recipient during a time period of 10 days

to 16 months after transplantation. For a deeper comprehension of microchimerism, more sensitive detection techniques are necessary to identify new alleles and to solve heterozygous combinations, since these are only being deciphered in an ambiguous way by current techniques. Research on this biological phenomenon has been of increasing international interest; its practical identification might be a future alternative in post-transplantation therapeutics to alleviate the undesirable action of immunosuppressive drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank our patients who accepted to participate in this research, as well as the Clinical Hospital of the Medical Science School of the State University of Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), Brazil and the Immunology Molecular Laboratory of the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirao Preto (FMRP-USP-SP), State of Sao Paulo, Brazil, for its support and infrastructure put at our disposal for this research.

REFERENCES

1. **TANIGUCHI, M.**; **SHAKIL, A. O.**; **VARGAS, H. E.**; **LASKUS, T.**; **DEMETRIS, A. J.**; **GAYOWSKIT, T.**; **DODSON, S. F.**; **FUNG, J. J.** & **RAKELA, J.** *Clinical and virologic outcomes of hepatitis B and C viral co-infection after liver transplantation: effect of viral hepatitis D.* *Liver Transpl* **6(1)**: 92-96, 2000.
2. **SANCHEZ, F.A.**; **RESTREPO J.C.**; **QUINTO L.**; **BRUGUERA M.**; **GRANDE L.**; **SANCHEZ-TAPIAS J.M.**; **RODES J.** & **RIMOLA A.** *Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft* *Transplantation* **15**:73 (1) 56-63, 2002
3. **DORAN, T.J.**; **GECZY, A.F.**; **PAINTER, D.**; **MCCAUGHAN, G.**; **SHEIL, A.G.**; **SUSAL, C.** & **OPELZ, G.** *A large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation.* *Transplantation* **69(7)**:1491-1498, 2000.
4. **STARZL, T. E.**; **DEMETRIS, A.J.**; **TRUCCO, M.**; **MURASE, N.**; **RICORDI, C.**; **ILDSTAD, S.**; **RAMOS, H.**; **TODO, S.**; **TZAKIS, A.** **FUNG, J. J.**; **NALESNICK, M.**; **ZEEVI, A.**; **RUDERT, W. A.** & **KOCOVA, M.** *Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance.* *Hepatology* **17**:1127-1152, 1992
5. **CALNE, RY.** *Immunological tolerance-the liver effect.* *Immunol Rev.* **174**:280-282, 2000
6. **DONALDSON, P.**, **Underhill, DOHERTY, D.**; **HAYLLAR k**; **Calne Roy**; **CHAH-T.K.**; **Grady, O, J**; **Wight, D**, **Portmann, B.** & **WILLIAMS, R.** *Influence of human leukocyte antigen matching on liver allograft survival and rejection: "The dualistic effect".* *Hepatology Vol. 17, N°6*, 1993
7. **FRANCAVILLA, R.**; **Hadzic, N.**; **Underhill, J**; **Heaton, N.**; **Rela, Mohamed**; **Vergani, G. M.** & **Donaldson, P.** *Role of HLA compatibility in pediatric liver transplantation.* *Transplantation Vol.66*, 53-58, N°1, July 23, 1998.
8. **CALNE, RY.** *Immunological tolerance - the liver effect.* *Immunol Rev.* **174**:280-282, 2000.

9. **BEIN, G., GLÄSER, R.; KIRCHNER, H.** *Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification.* Tissue Antigens **39**: 68-73, 1992.
10. **TRIULZI, D.J. & Nalesnik, M. A.** *Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation.* Transfusion, **41**: 419-426, 2001.
11. **NIKAEIN, A.; Backman, L.; Jennings, L.; Levy, M.; Goldstein, R.; Gonwa, T.; Stone, M.; Klintmalm G.** *HLA compatibility and liver transplant outcome.* Transplantation **58**:786-792, no. 7, 1994.
12. **NIKAEIN, A.; Backman, L.; Jennings, L.; Levy, M. F.; Goldstein, R.; Gonwa, T.; Stone, M. J.; Klintmalm G.** *HLA compatibility and liver transplant outcome: improved patient survival by HLA and crossmatching.* Transplantation Proceedings, **27**:1186-1188, 1995.
13. **POLI, F.; Frison, S.; Cardillo, M.; Scalamogna, M; Longhi, E.; Crespiatico, L.; Porta, E.; Sirchia, G.** *A retrospective analysis of HLA matching and other factors on liver graft outcome.* Transplantation Proceedings, **33**, 1368-1369, 2001.

Table 1-Characteristics of patients and recipient/donor HLA-DRB1 alleles (donor specific HLA-DR allele used for donor cell detection in *italics*)

<i>Patients</i>	<i>Age</i>	<i>Sex</i>	<i>Pre-transplant Diagnosis</i>	<i>Alleles HLA-DRB1</i>	
				<i>Recipient</i>	<i>Donor</i>
1	52	M	Alcoholic Cirrhosis	*01,*07	*03,*11
2	48	M	Cirrhosis C Virus	*07	*04,*14
3	15	M	Hepatitis Autoimmune	*13	*04,*08
4	37	M	Alcoholic Cirrhosis	*03	*01,*13
5	42	M	Cirrhosis C Virus	*15,*03	*01*03
6	50	M	Cirrhosis C Virus	*15,*16	*04,*15
7	49	M	Cirrhosis C Virus	*03,*13	*04,*16
8	54	F	Cirrhosis C Virus	*07,*11	*11,*15
9	58	F	Cirrhosis C Virus	*13,*15	*08,*14
10	51	M	Cirrhosis C Virus	*04	*03,*07
11	34	M	Cirrhosis C Virus	*12,*15	*07,*15
12	56	M	Alcoholic Cirrhosis	*15,*03	*07,*15
13	16	M	Alcoholic Cirrhosis	*13,*14	*01,*03
14	53	M	Cirrhosis C Virus	*11	*11,*08
15	36	F	Cirrhosis C Virus	*07,*15	*07,*08
16	17	F	Hepatitis Autoimmune	*03,*08	*16,*08
17	46	M	Cirrhosis C Virus	*11,*16	*03,*16
18	45	M	Cirrhosis C Virus	*13,*10	*03,*10
19	62	M	Cirrhosis C Virus	*04,*11	*07
20	60	F	Cirrhosis C Virus	*03,*14	*03,*11
21	46	M	Alcoholic Cirrhosis	*04*08	*07,*08
22	59	F	Cirrhosis C Virus	*07	*03,*15
23	65	M	Alcoholic Cirrhosis	*01	*01,*13
24	63	M	Hepatitis Autoimmune	*07*13	*01
25	54	F	Hepatitis Autoimmune	*07,*12	*11,*12
26	47	M	Cirrhosis C Virus	*08,*14	*13,*14
27	34	M	Alcoholic Cirrhosis	*07*16	*07,*13
28	52	M	Cryptogenic Cirrhosis	*07	*01,*15
29	46	F	Cirrhosis C Virus	*11	*01,*13
30	55	F	Cirrhosis C Virus	*04*15	*11,*15
31	43	M	Cirrhosis C Virus	*07,*11	*11,*13
32	40	M	Cirrhosis C Virus	*03,*13	*07,*13

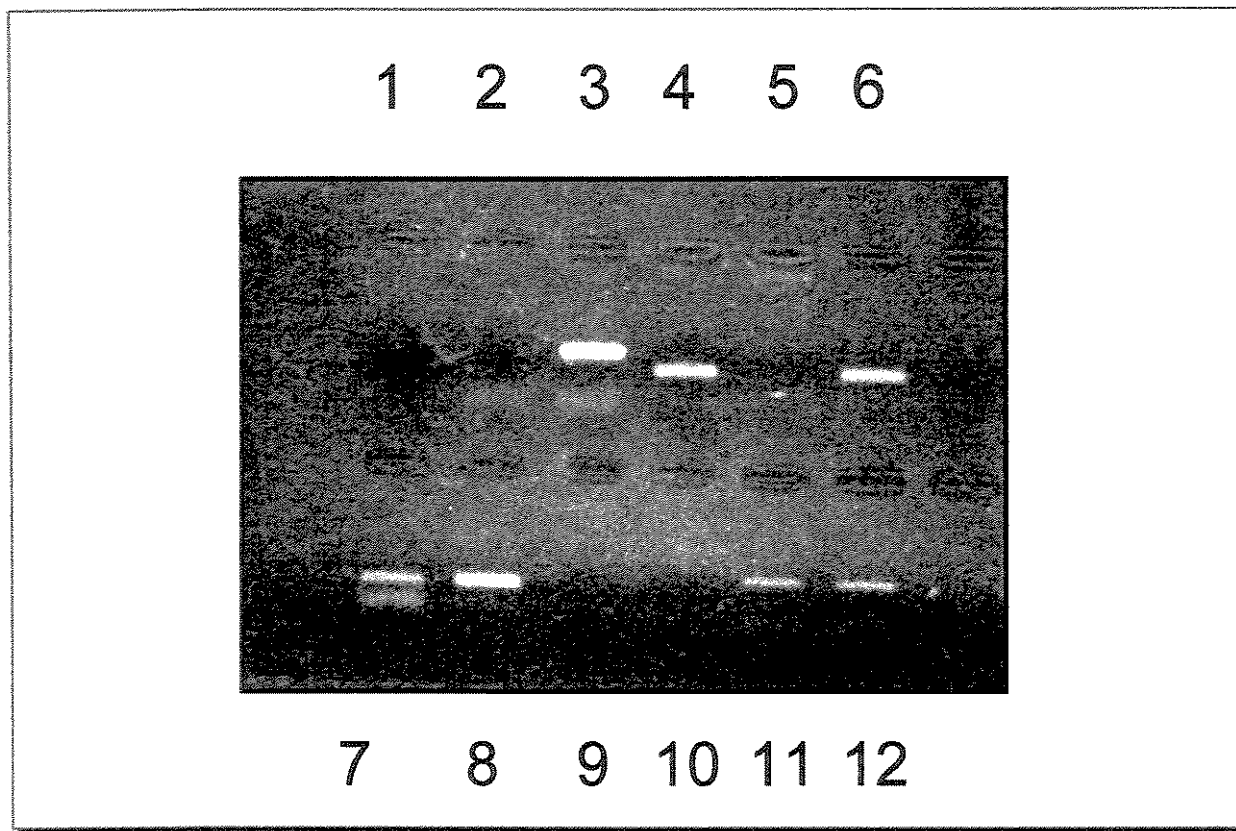


FIGURE 1-DETECTION OF MICROCHIMERISM USING NESTED-PCR-SSP TYPING. Negative Controls can be found in lane 1 and 2 (DNA sample of pre-transplantation patients). Lane 3 and 4 show detection of (donor) DRB1*03,*11 in DRB1*01,*07 in liver recipient. No donor alleles were detected in recipients in lane 5. In lane 6 and 7, (donor) DRB1*04,*16 alleles were detected in DRB1* 03,*13 of recipient. In lane 8, (donor) DRB1*04 allele was found in DRB1* 15,*16 of recipient. No donor alleles were detected in recipients in lanes 9 e 10; however, donor alleles were detected in recipients in lanes 11 e 12.

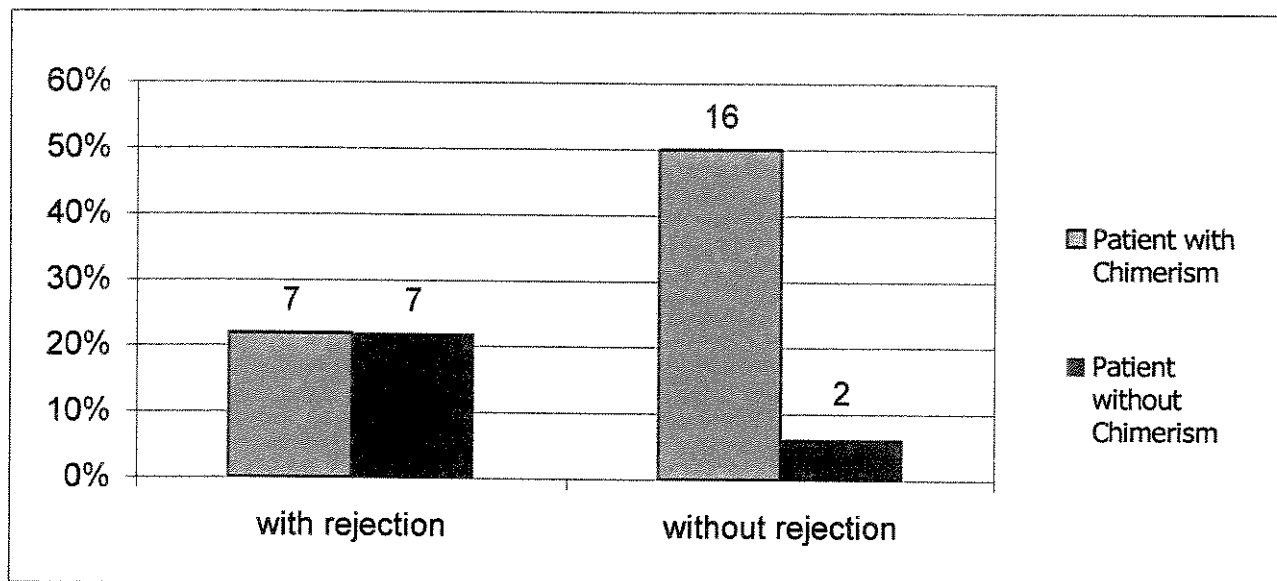


FIGURE 2-DETECTION OF MICROCHIMERISM AND ITS ASSOCIATION TO REJECTION

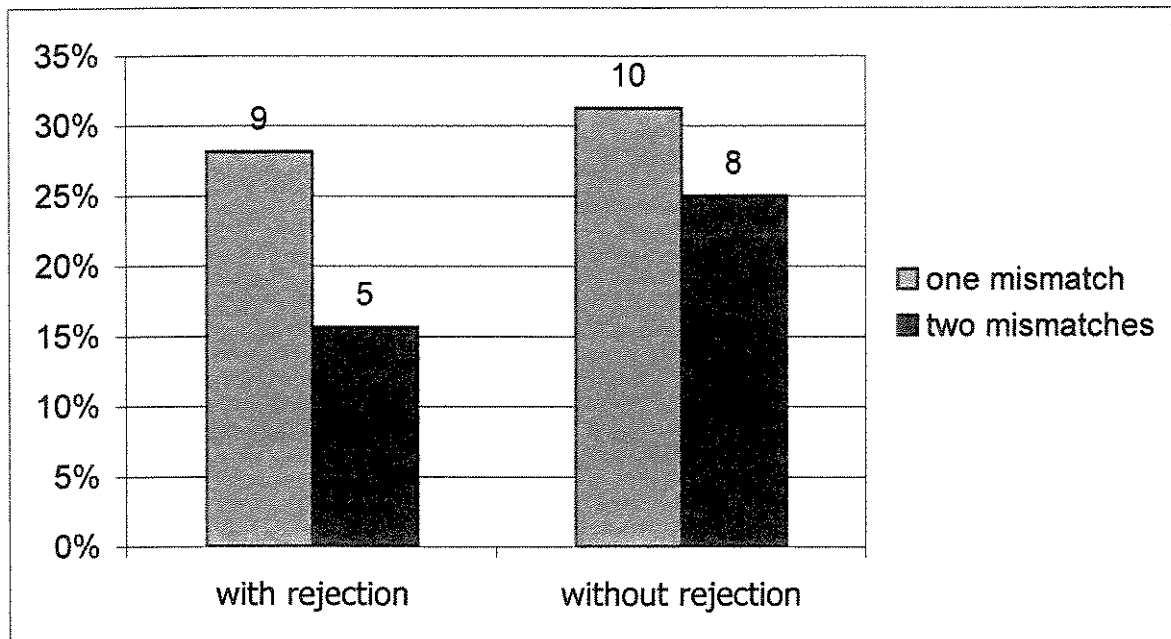


FIGURE 3-HLA-DRB1 MISMATCHES IN RECIPIENT/DONOR ASSOCIATED TO REJECTION

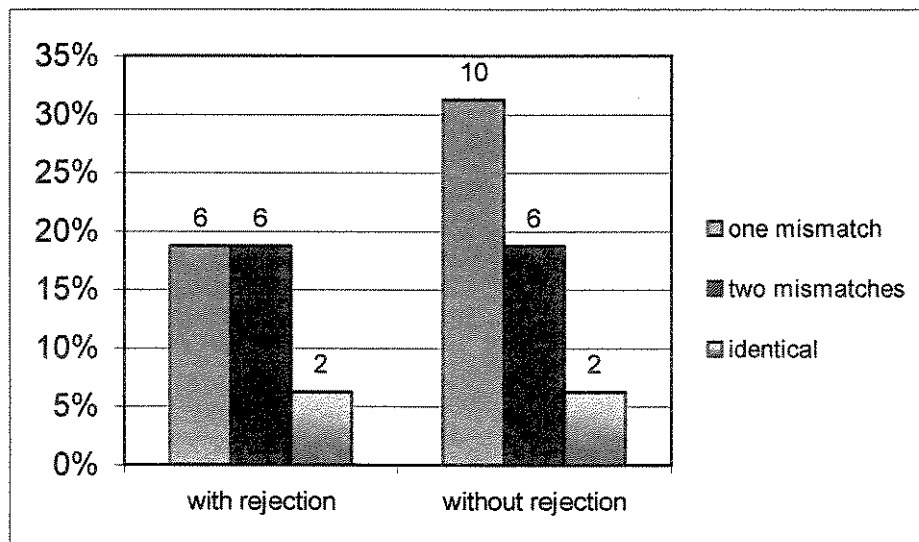


FIGURE 4-HLA-DQB1 MISMATCHES IN RECIPIENT/DONOR ASSOCIATED TO REJECTION