

**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer (INCA)**  
**Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu**



**Gabriela Lemos Ferreira**

*Estudo proteômico do plasma de pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro aguda: identificação de biomarcadores*

**Orientadora:** Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

**Co-orientadora:** Dra. Luciana Pizzatti

**Rio de Janeiro**

**2014**

**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer (INCA)**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia

**Gabriela Lemos Ferreira**

*Estudo proteômico do plasma de pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro  
aguda: identificação de biomarcadores*

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto  
Nacional de Câncer como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Oncologia

**Orientadora:** Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

**Co-orientadora:** Dra. Luciana Pizzatti

Rio de Janeiro

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

F383e Ferreira, Gabriela Lemos.

Estudo proteômico do plasma de pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro aguda: identificação de biomarcadores./ Gabriela Lemos Ferreira. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

xv.; 76f.; il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadora: Eliana Abdelhay.

Co-orientadora: Luciana Pizzati.

1. Transplante de Medula Óssea. 2. Doença de Enxerto-Hospedeiro. 3. Biomarcadores Farmacológico. 4. Proteômico. I. Abdelhay, Eliana(Orient.). II. Pizzati, Luciana (Co-orient.). I. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. II. Título.

CDD 616.99441



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

**Gabriela Lemos Ferreira**

*Estudo proteômico do plasma de pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro aguda: identificação de biomarcadores*

**Orientadora: Dra. Eliana Abdelhay**

**Co-orientadora: Dra. Luciana Pizzatti**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Claudia Esther Rocio Hassan

**Prof. Dr.** Martin Bonamino

**Prof. Dr.** André Mencialha

**Prof. Dra.** Tatiana Simão

**Prof. Dra.** Sheila Coelho

Rio de Janeiro

2014

*Dedico esta tese aos meus queridos pais,*

*Elisete e Luiz*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir concluir este trabalho e mais uma etapa da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Eliana Abdelhay, por todos os anos de orientação, atenção e valiosos ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de continuar crescendo ao seu lado.

À Dra Luciana Pizzatti, pela co-orientação, por toda ajuda e dedicação. Muito obrigada pelos conselhos, conversas e confiança que me fizeram amadurecer e chegar até aqui.

Aos amores da minha vida, meus pais Elisete e Luiz por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me dando forças para seguir em frente.

À minha querida avó Ana e minha tia Elisabete que agora estão perto de Deus. Muito obrigada por todo amor e carinho sempre dedicados a mim.

Ao meu namorado André Rodrigues, por todo carinho, companheirismo e por ser o meu maior incentivador.

Aos meus queridos amigos do laboratório de célula-tronco: Renata Binato, Stephany Corrêa, Bárbara Du Rocher, Nathália Corrêa, Bruno Pires, Tatiana Dutra, Yve Cardoso, Gerson Ferreira, Lilian Ayres, Priscila, Thaís e Lydiane por toda a ajuda, conselhos e momentos de descontração. Tenho um carinho enorme por cada um de vocês. Muito obrigada.

À Carolina Panis pela amizade e colaboração nos experimentos.

À Mayara Rezende pelo companheirismo, amizade e processamento das amostras de pacientes utilizadas neste trabalho.

À equipe clínica do CEMO, em especial aos enfermeiros do hospital dia e da internação do CEMO, pela coleta das amostras, e às médicas Simone e Maria Cláudia.

E por fim, agradeço a todos os pacientes do CEMO que aceitaram participar deste estudo.

*A coisa mais bela que podemos experimentar  
é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e  
ciência verdadeira.*

*Albert Einstein*



Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

## RESUMO

### Dissertação de Mestrado

#### ***Estudo proteômico do plasma de pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro aguda: identificação de biomarcadores***

A Doença enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa) é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogeneico. A identificação e quantificação absoluta de proteínas e peptídeos diferencialmente expressos no plasma de pacientes que desenvolveram DECHa é de extrema importância por representar uma nova estratégia de diagnóstico precoce e menos invasiva do que as biópsias dos órgãos acometidos. Sendo assim, propusemos avaliar o perfil proteômico do plasma de pacientes com DECHa a fim de identificarmos possíveis biomarcadores dessa doença. Neste estudo, foram analisadas amostras de plasma do dia D+45, categorizadas em Pools, de 31 pacientes submetidos ao TCTH alogeneico e que tinham como doença de base LMA: 20 pacientes desenvolveram DECHa e 11 pacientes não desenvolveram DECHa. As amostras foram concentradas 16x com colunas de 3k amicon (Millipore), digeridas em solução e analisadas por cromatografia multidimensional (MudPIT) no sistema de espectrometria de massas 2D-NanoESI-MS<sup>E</sup>(MudPIT) utilizando o espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters). As proteínas foram identificadas e quantificadas utilizando o software Proteinlynks global Server (Waters) com a ferramenta Expression E. As proteínas encontradas como diferencialmente expressas nos pacientes com DECHa foram validadas utilizando as técnicas de Western Blot no plasma, RTq-PCR tempo real e imunohistoquímica em biópsias de pele dos pacientes. Através de análises proteômicas foram identificadas 161 proteínas, 90 dessas proteínas apresentaram-se diferencialmente expressas nos pacientes com DECHa (65 com a expressão aumentada e 25 com a expressão diminuída). Baseado na análise *in silico* utilizando o *software* MetaCore foi identificado que as principais vias de sinalização alteradas nos pacientes com DECHa estão relacionadas com inflamação e coagulação sanguínea. A expressão das proteínas Trombina e cininogênio I foram confirmadas por Western Blot no plasma dos pacientes com DECHa. Dentre as proteínas identificadas como superexpressas nos pacientes com DECHa, destacamos a proteína NALP12 que está relacionada com a ativação de caspases pró inflamatórias e faz parte de um complexo multiproteico chamado inflamossoma. A superexpressão de NALP12 e a ativação do complexo inflamossoma mediado pela expressão de IL-1 $\beta$  nos pacientes com DECHa foi confirmada por western blot no plasma utilizando a análise comparativa em Pool e individualmente de pacientes com DECHa e sem DECHa. A expressão desta proteína também foi encontrada diferencialmente expressa nas biópsias de pele dos pacientes com DECHa. Os níveis de mRNA do gene NALP12 também encontrou-se aumentado nos pacientes com DECHa. Nossos resultados apontam a proteína NALP12 como uma molécula importante no desenvolvimento da doença, sendo revelada como um possível biomarcador circulante de DECHa.



## ABSTRACT

### Dissertação de Mestrado

#### *Plasma proteomic study of patients with acute graft-versus-host disease: identification of biomarkers*

The acute graft-versus-host disease (aGVHD) is a serious complication of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (HSCTs) and a major cause of morbidity and mortality among patients undergoing this therapy. Recently, proteomic strategies have been applied in order to identify molecules that might participate in the biological processes that lead to aGVHD. These techniques allow the identification and absolute quantification of proteins and peptides differentially expressed in the plasma of patients who developed aGVHD and therefore they are an useful tool for the early diagnosis. Moreover they constitute an alternative to the invasive biopsies procedures of the affected organs. This study, the objective is to identify plasma proteins that could be potential candidates as biomarkers of aGVHD. In this study, pool samples of plasma from 31 patients (20 with aGVHD/11 without aGVHD) collected after 45 days post transplantation were concentrated, digested in solution and analyzed by multidimensional chromatography and mass spectrometry (2D NanoESI MS<sup>E</sup>) using Synapt HDMS mass spectrometer (Waters) system. *In silico* analysis of the differentially expressed proteins was performed using MetaCore™ software. The proteins found differentially expressed in patients with GVHD were validated through western blotting (plasma samples), RT-qPCR (peripheric blood samples) and immunohistochemistry (skin biopsies). The proteomic analysis resulted in the identification of 161 proteins. Of these, 90 proteins were differentially expressed in patients with aGVHD (65 increased and 25 decreased). *In silico* analysis showed that these proteins participate in important signaling pathways associated with blood clotting and inflammation. For instance, thrombin and kininogen I, both crucially involved in blood clotting, were found increased in aGVHD patients which was confirmed by western blotting. Among the other overexpressed proteins in aGVHD patients, we highlight NALP12 protein. This protein is involved in the activation of pro-inflammatory caspases and belongs to a multiprotein complex called inflammasome whose main function is to convert the procytokine IL-1 $\beta$  in its active form. Overexpression of NALP12 and activation of the inflammasome complex mediated by IL-1 $\beta$  in patients with aGVHD was confirmed by western blotting using plasma pool samples and comparative analysis of individual patients. Immunohistochemistry showed that NALP12 was also overexpressed in skin biopsies of patients with aGVHD. The mRNA levels of NALP12 were also found increased in the peripheric blood of these patients. Our results suggest that NALP12 protein is an important molecule in the development of aGVHD and could possibly be a circulating biomarker of the disease.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACN → Acetonitrila
- ADH → Álcool desidrogenase
- APCs → “Antigen presenting cells” ou células apresentadoras de antígeno
- ATG → antitimoglobulina
- Bu → Bussulfano
- CEMO → Centro de Estudos de Medula Óssea
- CTHs → Células tronco hematopoéticas
- CTLs → Cytolytic T Lymphocyte ou linfócito T citotóxico
- CuSO<sub>4</sub> → Sulfato de cobre
- CSA → Ciclosporina
- CY → Ciclofosfamida
- DAB → Diaminobenzidina
- DAMPS → “Damage-associated molecular patterns” ou padrões moleculares associados a danos celulares
- DIPAT → Departamento de Patologia do INCA
- DCs → Células dendríticas
- DECH → Doença enxerto-contra-hospedeiro
- DECHa → Doença enxerto-contra-hospedeiro aguda
- DNA → "deoxyribonucleic acid" ou ácido desoxirribonucleico
- DTT → Ditioneitol
- ECL → Efeito enxerto-contra-leucemia
- EUA → Estados Unidos da América
- HLA → “Human leucocyte antigen” ou antígeno leucocitário humano
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> → Ácido sulfúrico
- IFN- $\gamma$  → Interferon- $\gamma$
- IL → Interleucina
- KNG I → Kininogen I ou cininogênio I
- LC → cromatografia líquida

LMA → Leucemia Mielóide Aguda

LPS → Lipopolissacarídeo

mRNA → *messenger Ribonucleic acid* ou Ácido Ribonucléico mensageiro

MHC → “Major histocompatibility complex” ou complexo principal de histocompatibilidade

MgCl<sub>2</sub> → Cloreto de Magnésio

MMF → Micofenolato mofetil

MO → Medula óssea

MS → “*mass spectrometry*” ou espectrometria de massas

MTX → Metotrexato

NaCl → Cloreto de sódio

NaNO<sub>2</sub> → Nitrito de sódio

NaOH → Hidróxido de sódio

NFκB → “Nuclear factor kappa B” ou fator nuclear kappa B

NK → “Natural Killer” ou células assassinas naturais

NO → Óxido Nítrico

PBS → Solução Tampão Fosfato

RPM → Rotações por minuto

RT-PCR → “*Polymerase Chain Reaction real time*” ou Reação da Polimerase em cadeia em tempo real

SCUP → Sangue de cordão umbilical e placentário

SDS → Dodecil sulfato de sódio

SMD → Síndrome Mielodisplásica

SPM → Sangue periférico mobilizado

TCTH → Transplante de células tronco hematopoéticas

TFA → Ácido trifluoroacético

TGF → “Transforming growth factor” ou fator transformador de crescimento

TGI → Trato gastrointestinal

TLR → “Toll like receptor” ou receptor semelhante ao Toll

TNF → “Tumor necrosis factor” ou fator de necrose tumoral

ZnSO<sub>4</sub> → Sulfato de cobre

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de evolução do TCTH.....	2
<b>Figura 2.</b> O modelo de três fases da DECHa.....	7
<b>Figura 3.</b> Lesões eritromatosas observadas na palma da mão e na planta dos pés de pacientes submetidos ao TCTHs, caracterizando estadiamento de pele grau I a II e formação de bolhas observadas na face de um paciente caracterizando estadiamento de pele grau IV.....	11
<b>Figura 4.</b> Distribuição cromatográfica bidimensional dos peptídeos obtida com o sistema <i>nanoACQUITY UPLC</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Processos biológicos impactados nos pacientes com DECHa.....	32
<b>Figura 6.</b> Principais vias de sinalização alteradas nos pacientes com DECHa.....	33
<b>Figura 7.</b> Via do sistema caliceína-cinina construída com o <i>software</i> MetaCore.....	34
<b>Figura 8.</b> Via da coagulação sanguínea construída com o <i>software</i> MetaCore.....	35
<b>Figura 9.</b> Validação por Western blot da proteína trombina.....	38
<b>Figura 10.</b> Validação por Western blot da proteína cininogênio I.....	39
<b>Figura 11:</b> Mapa de interação da proteína NALP12.....	40
<b>Figura 12.</b> Validação por Western blot da citocina IL1 beta e da proteína NALP12 no plasma dos pacientes com DECHa.....	42
<b>Figura 13.</b> Imunohistoquímica com anticorpo anti-NALP12 em cortes histológicos de biópsias de pele.....	44

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.O transplante de células tronco hematopoiéticas.....	1
2. A Doença Enxerto Contra o Hospedeiro.....	3
3. A Doença enxerto contra o hospedeiro aguda e sua patofisiologia.....	5
3.1. Fase I: ativação das APCs pelo regime de condicionamento.....	6
3.2. Fase II: Ativação, proliferação, diferenciação e migração das células T do doador.....	8
3.3. Fase III: Fase efetora da doença com destruição dos tecidos-alvo.....	8
4. Características clínicas da DECHA.....	10
5. A importância da descoberta de biomarcadores de DECHA .....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
1. Objetivo geral.....	17
2. Objetivos específicos.....	17
<b>METODOLOGIA</b> .....	18
1.Pacientes e amostras.....	20
2. Preparação das amostras de plasma.....	20
3. Análise proteômica .....	20
3.1.Etapa de concentração e digestão de proteínas.....	20
3.2. Condições experimentais das análises de espectrometria de massas.....	22
3.3. Identificação e quantificação de proteínas.....	22
3.4. Análise <i>in silico</i> dos dados proteômicos.....	23
4. Validação das proteínas candidatas a biomarcadores por Western blot.....	23
5. Extração de DNA e RNA das células mononucleares.....	24
6. Análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real.....	24
7. Determinação de nitrito plasmático como estimativa das concentrações plasmáticas de óxido nítrico (NO).....	25
7.1. Processamento das amostras.....	25
7.1.1. Desproteínização.....	25
7.1.2. Ativação dos grânulos de cádmio.....	26
7.1.3. Redução de nitrato a nitrito.....	26
7.1.4. Preparo da curva padrão.....	26
7.1.5. Reação de Griess .....	26
8. Experimentos de Imunohistoquímica.....	27
8.1. Coleta de biópsia de pele.....	27

8.2. Diagnóstico histológico da DECHa .....	27
8.3. Imunohistoquímica .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	30
1. Análise proteômica por cromatografia líquida multidimensional MudPiTT.....	30
2. Processos biológicos e vias de sinalização envolvendo as proteínas diferencialmente expressas no plasma dos pacientes com DECHa .....	31
3. Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico no plasma dos pacientes com DECHa.....	36
4. Validação de proteínas envolvidas nas vias de coagulação sanguínea e do sistema calicreína-cinina.....	37
5. Identificação da proteína NALP12 como biomarcador circulante de DECHa .....	39
6. Validação da superexpressão da proteína NALP12 e do complexo inflamossomo no plasma dos pacientes com DECHa.....	41
7. Validação da superexpressão da proteína NALP12 na pele dos pacientes com DECHa.....	45
<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56
<b>ANEXOS</b> .....	62

## Introdução

### **1) O transplante de células tronco hematopoiéticas**

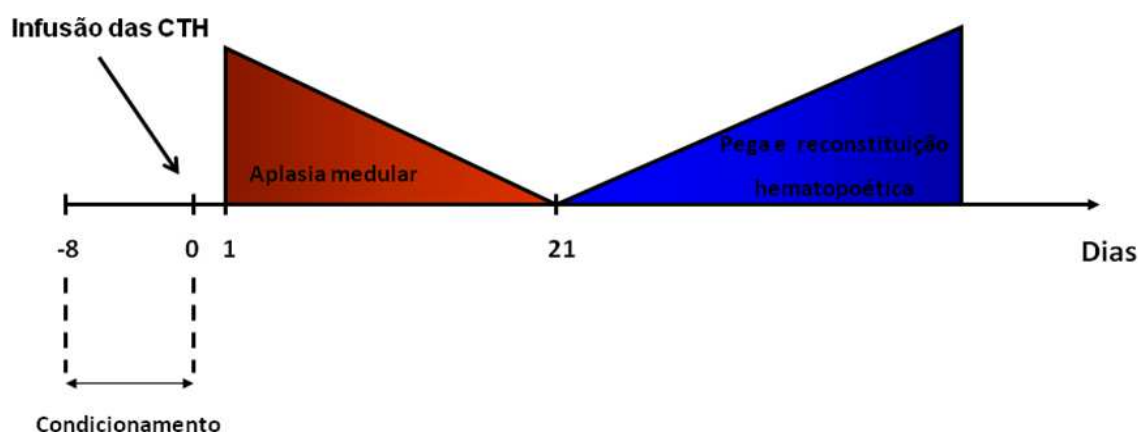
Durante a última metade do século XX o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) tornou-se uma modalidade terapêutica bem estabelecida, utilizada para tratar milhares de indivíduos anualmente (APPELBAUM, 2003). O TCTH consiste na infusão intravenosa de células progenitoras hematopoiéticas a fim de restabelecer a hematopoiese em pacientes com algum defeito ou dano na medula óssea (ARMITAGE, 1994).

O TCTH pode ser classificado como autólogo, alogeneico e singeneico. No transplante autólogo, as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) são removidas do próprio paciente, criopreservadas e reinfundidas posteriormente. O transplante alogeneico ocorre quando as CTHs infundidas são originadas de um doador, podendo ser parente ou não. E, por fim, o transplante singeneico ocorre quando as CTHs são originadas de um irmão gêmeo geneticamente idêntico (APPELBAUM, 2003).

Antes de se submeterem ao TCTH, os pacientes são submetidos ao regime de condicionamento, que consiste em doses de quimioterapia, geralmente acompanhadas de radioterapia. Este procedimento nada mais é do que uma imunossupressão do hospedeiro a fim evitar a rejeição ao enxerto e no caso de doenças malignas, para reduzir o número de células malignas. A intensidade do regime de condicionamento varia de acordo com o tipo de doença e a condição clínica do paciente. No caso de doenças malignas linfocitárias, é utilizado o regime de condicionamento mieloablativo, onde o sistema imune do paciente é completamente destruído. Para pacientes portadores desse tipo de doença, a função primordial do TCTH é reparar um dano irreversível causado pelo tratamento mieloablativo (STOREK *et al*, 2008). O TCTH também pode ser considerado, não-mieloablativo quando o sistema imune do paciente não sofre total depleção.



O regime de condicionamento é seguido pela infusão das CTHs intravenosamente. Estas células migram para o microambiente medular, fenômeno conhecido como “homing” e, a partir desse momento começa a reconstituição hematológica e imunológica do paciente. Clinicamente, a “pega medular” é considerada após 3 dias consecutivos de contagem de neutrófilos, o que ocorre por volta do dia D+21 (Figura1). Do período compreendido entre o dia do TCTH (D0) e o início da recuperação hematológica (D+21), o paciente encontra-se em aplasia medular, ou seja, imunossuprimido e susceptível a infecções virais, fúngicas e bacterianas;



**Figura 1 – Esquema de evolução do TCTH.** D-8 ao D0: Período que o paciente é submetido ao regime de condicionamento. D+1 ao D+21: Período em que o paciente encontra-se imunossuprimido, este período é de aproximadamente 21 dias. D+21 em diante: Período aproximado em que a reconstituição hematopoiética é detectada clinicamente. Adaptado de DU ROCHER, 2012.

O TCTH alogeneico representa uma importante terapia utilizada para várias doenças malignas e não malignas do sistema linfematopoiético. O efeito enxerto *versus* leucemia ou enxerto *versus* tumor durante este procedimento pode erradicar efetivamente a doença e o desenvolvimento de novas estratégias como infusão de linfócitos do doador (DLI), TCTH não-mieloablativo e transplante de sangue de cordão umbilical tem ajudado a expandir as indicações para o TCTH alogeneico, especialmente em pacientes idosos (WELNIAK *et al*, 2007). Entretanto, uma das maiores complicações e limitações deste tipo de transplante é a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (FERRARA & REDDY, 2006).

## 2) A Doença Enxerto Contra o Hospedeiro

A DECH é caracterizada, basicamente, por fatores imunológicos e consiste no reconhecimento de estruturas antigênicas do receptor como “não semelhantes” pelos linfócitos do doador, causando injúria tissular em vários órgãos como pele, fígado e trato gastrointestinal. (BAKER *et al*, 1996; FERRARA & DEGG, 1991).

A primeira descrição de DECH veio de experimentos documentados em roedores que tiveram reconstituição hematopoiética após irradiação letal da medula (BILLINGHAM *et al*, 1959). Animais que receberam enxertos de células-tronco singenéticas, ou seja, células retiradas de animais isogênicos, recuperaram-se da toxicidade da radiação (doença primária) e aparentavam normalidade. Animais que receberam os enxertos de células-tronco de descendência diferente, ou seja, com diferentes MHC (Complexo maior de histocompatibilidade), recuperaram-se da doença primária, porém desenvolveram uma doença secundária, que hoje é conhecida como DECH. Estes animais desenvolveram eritema, diarreia, doença hepática, e todos esses sintomas levavam a uma destruição severa que resultava em morte (BARNES *et al*, 1956).

Billingham postulou as condições necessárias para a indução da DECH (BILLINGHAM,1966). Primeiro, o enxerto deve conter células imunologicamente competentes. Segundo, o hospedeiro tem que parecer estranho para o enxerto e deve ser capaz de estimular as células do doador. E, finalmente, o sistema imune do hospedeiro deve ser incapaz de gerar resposta imune (evitando assim a rejeição do enxerto), por um tempo suficiente para que o enxerto seja sensibilizado e o ataque imunológico ao hospedeiro seja aumentado. Diferenças antigênicas estimulam os linfócitos do doador a atacar primeiramente as células epiteliais e membranas mucosas na pele, trato gastro-intestinal e ductos biliares.

Essas diferenças antigênicas entre as células do doador e do receptor se dá por um conjunto de proteínas que contribuem para a determinação da individualidade, que são

expressas em co-dominância e são codificadas por um complexo gênico altamente polimórfico denominado complexo maior de histocompatibilidade (MHC).

O MHC compreende cerca de 3Mb localizadas no braço curto do cromossomo 6. Esta região contém cerca de 200 genes (BECK & TROWSDALE, 1999; SHIINA *et al.*, 1999), dos quais muitos estão envolvidos com resposta imune e alguns exibem um extensivo polimorfismo genético. Em humanos, o MHC é chamado de antígeno leucocitário humano (HLA). Os genes que codificam moléculas HLA classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP) são os *loci* com maior polimorfismo humano, onde cada *locus* (por exemplo o HLA-B ou DRB1) tem mais de 300 alelos (MARSH, 2000). Os HLAs de classe I estão envolvidos na apresentação de peptídeos para as células T CD8+ e as moléculas de classe II apresentam antígenos para as células T CD4+.

Na DECH, o ataque aos tecidos do receptor do enxerto de células-tronco é mediada pelas células T aloreativas (DENNERT *et al.*, 1985; HANSEN *et al.*, 1997). Moléculas de HLA tem um efeito maior no transplante, devido ao papel fundamental que desenvolvem na ativação das células T e na aloresposta. Uma quantidade significativa das células T circulantes são aloreativas, isto é, elas reconhecem HLAs estranhos, ou “*nonsel*”. As diferenças estruturais codificadas pelas sequências de polimorfismos no HLA classe I e II induzem a ativação das células T e as reações imunológicas mediadas pelas células T aloreativas e pelos anticorpos anti-HLA produzidos pelas células B.

Mesmo com HLAs idênticos entre pacientes e doadores, um grande número de pacientes ainda desenvolvem DECH. Isto está relacionado a diferenças nos antígenos de histocompatibilidade menor. A existência de sistemas de antígenos segregados não-HLA tem sido mostrada em diversos modelos animais. Entretanto, estes antígenos não foram precisamente definidos em humanos (GOULMY *et al.*, 1996). A maioria dos antígenos menores é expressa na superfície celular como peptídeos degradados ligados a moléculas de HLA específicas. Por isso, a seleção de um doador sem familiares é limitada. O paciente tem

cerca de 20 a 30% de chances de encontrar um doador compatível entre sua família. Quando não existem doadores compatíveis dentro da própria família, existe a possibilidade de se recorrer à um banco de doadores voluntários ou banco de sangue de cordão umbilical (VOGELSANG *et al.*, 2003). Porém, transplantes alogeneicos não aparentados aumentam ainda mais a chance do paciente desenvolver a DECH.

Outros fatores relevantes tem sido identificados como fatores de predisposição dos pacientes a desenvolverem DECH como a idade do receptor e do doador, diferenças de sexo (doadora feminina e paciente masculino, por exemplo), fonte e dose das células tronco hematopoéticas, a intensidade do regime de condicionamento, e a profilaxia utilizada para DECH (MARTIN *et al* 2003).

Estabelecido o conceito de DECH, sabe-se que a doença pode se manifestar da forma aguda ou crônica (VOGELSANG *et al*, 2003). A DECH aguda ocorre nas primeiras semanas após o transplante, sendo mais freqüente e severa quando os HLAs não são idênticos ou no transplante não-relacionado. A DECH crônica é uma doença ainda pouco conhecida. Antigamente o paciente que apresentasse a doença de 100 dias pós-transplante ou que fosse uma DECH aguda continuada até depois do dia 100 pós-transplante era classificado como DECH crônica. Hoje em dia sabemos que a DECH aguda pode se manifestar até três meses após o transplante, assim como os sintomas da DECH crônica podem se desenvolver juntamente com a aguda, e ocorrerem concomitantemente em um fenômeno conhecido como síndrome “*overlap*” (FILIPOVICH *et al.*, 2005).

### **3) A Doença enxerto contra o hospedeiro aguda e sua patofisiologia**

A DECH aguda (DECHa) é uma reação imunológica onde as células T do doador ativadas causam dano às células epiteliais do hospedeiro. Cerca de 35% a 50% dos pacientes submetidos ao TCTH desenvolvem algum grau de DECHa. (JACOBSON &

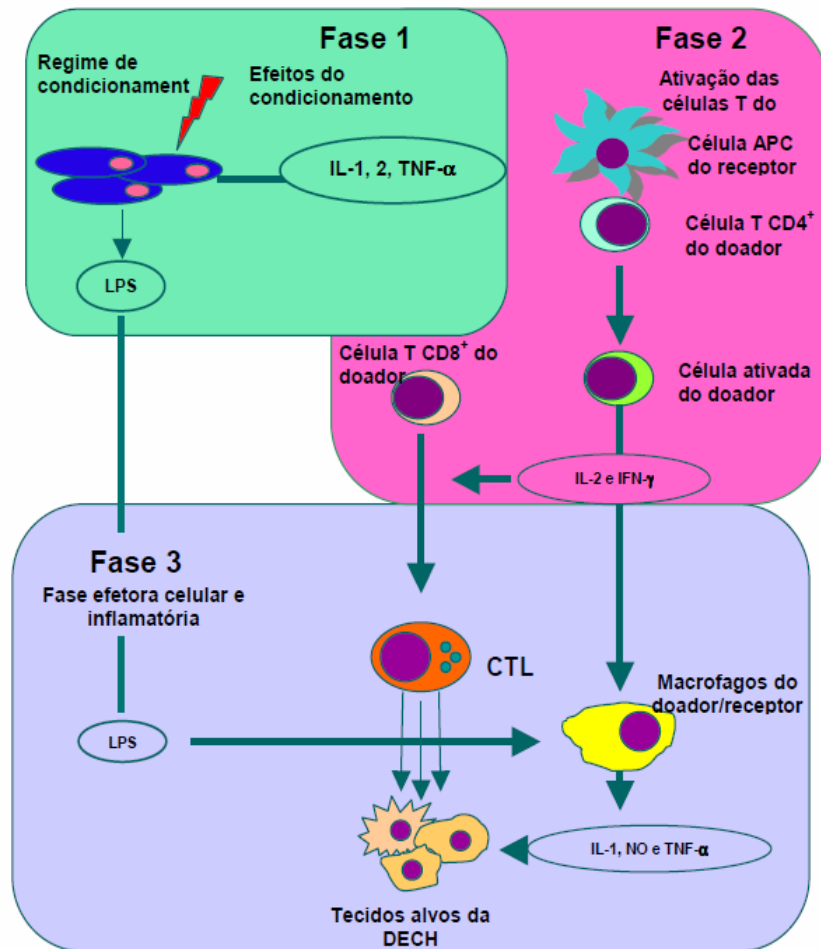
VOGELSANG, 2007). Os três principais órgãos de acometimento da DECHa são pele, fígado e trato gastrointestinal e um ou mais órgãos podem estar envolvidos na doença.

A patofisiologia da DECHa pode ser dividida em um modelo de 3 fases: Fase I – Ativação das APCs (células apresentadoras de antígenos) pelo regime de condicionamento, Fase II – ativação, proliferação, diferenciação e migração das células T do doador e Fase III- Fase efetora com destruição dos tecidos-alvo da doença (FERRARA *et al.*, 2009). As primeiras duas fases constituem a fase aferente da DECHa e fase III é a fase eferente. Este modelo de três fases está exemplificado na figura 2.

### **3.1) Fase I: ativação das APCs pelo regime de condicionamento**

Podemos dizer que o primeiro passo da DECHa ocorre durante o regime de condicionamento, uma fase que ocorre antes das células do doador serem infundidas no paciente. A terapia de condicionamento, que inclui quimioterapia e/ou radioterapia, é muito tóxica para os tecidos e leva ao dano e ativação (inflamação) dos tecidos dos pacientes, incluindo mucosa intestinal, fígado e outros tecidos. Os tecidos injuriados respondem com a produção de fatores, como quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão, que sinalizam ao sistema imune que a injúria ocorreu, resultando em uma resposta inflamatória (FERRARA, 1993). Assim, quando as células do doador são infundidas no paciente cujos tecidos já foram danificados por diversos fatores (tais como a doença de base do paciente e seu tratamento prévio, infecções, e o regime de condicionamento constituído de altas doses de quimioterápicos administrados antes do TCTH), citocinas inflamatórias já secretadas pelas células ativadas do paciente, sendo as mais comuns TNF- $\alpha$  e IL-1 (XUN *et al.*, 1994). A presença de citocinas inflamatórias nesta fase aumenta a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e moléculas de HLA (CHANG & LEE, 1986; POBER *et al.*, 1996). Estas moléculas levam a ativação das células dendríticas e reconhecimento do HLA do hospedeiro pelas células T maduras do doador (MATZINGER, 2002). O TNF- $\alpha$  ainda contribui na injúria intestinal, afetando a integridade da mucosa

intestinal diretamente. Isto resulta na liberação de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, que pode escapar através da mucosa danificada, e que sinaliza aos linfócitos e macrófagos presentes no intestino a produzir mais TNF- $\alpha$  e IL-1. A liberação de LPS e ativação dos linfócitos e macrófagos resultam na amplificação da injúria tecidual local e promovem a resposta inflamatória.



**Figura 2: O modelo de três fases da DECHA.** Durante a fase 1, o regime de condicionamento (irradiação e/ou quimioterapia) leva a dano e ativação dos tecidos do hospedeiro e a indução da secreção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1). Aumento da expressão de antígenos HLA e moléculas de adesão levam ao aumento do reconhecimento do HLA do hospedeiro pelas células T maduras do doador. Durante a fase 2, células T do doador proliferam e secretam IL-2 e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas induzem ainda mais a expansão das células T, induzem as resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) e das células natural killer (NK), e mais importante, induzem os macrófagos a produzir TNF- $\alpha$  e IL-1. Ainda, óxido nítrico (NO) é produzido por esses macrófagos ativados, o que contribui para a injúria tissular durante a fase 3. Lipopolissacarídeo (LPS), que é liberado pela mucosa intestinal que foi danificada na fase 1, juntamente com o IFN- $\gamma$ , da fase 2, estimulam ainda mais os macrófagos a secretar citocinas e NO. Durante a fase 3, CTLs e NKs induzem a destruição dos tecidos alvos através da citotoxicidade mediada por células. Adaptado de JAKSCH *et al.*, 2005.

### **3.2) Fase II: Ativação, proliferação, diferenciação e migração das células T do doador\_**

Apresentação dos antígenos do paciente às células T do doador, ativação das células T do doador e proliferação e diferenciação destas células T ativadas são os passos cruciais na segunda fase da DECHa. Após a infusão do enxerto, as células T contidas no enxerto reconhecem antígenos estranhos do hospedeiro apresentados pelas APCs. Quanto maior a disparidade entre os HLAs do doador e do paciente, maior será a resposta das células T.

A ligação do receptor de células T com o peptídeo apresentado pela molécula de HLA contida na superfície das APCs determinam a sinalização inicial para a estimulação das células T. Entretanto, um segundo sinal co-estimulatório é necessário para a estimulação completa das células T. O resultado do primeiro sinal é regulado pelo segundo sinal. Três resultados podem ocorrer: ativação completa, ativação parcial ou anergia. Um crescente número de vias co-estimulatórias da célula T tem sido identificadas (DENTON *et al.*, 1999; SALAMA *et al.*, 2001), porém as vias mais importantes parecem ser mediadas pelas interações entre CD28 com B7 e CD40 com seu ligante CD154. A ativação e proliferação das células T é seguida pela secreção de citocinas e quimiocinas (HO & GLIMCHER, 2002). A ativação envolve múltiplas vias, que acabam por ativar a transcrição dos genes para citocinas, como IL-2, IFN- $\gamma$  e seus receptores (TSENG & DUSTIN, 2002).

Uma vez que as células T do doador estejam ativadas e proliferando, elas são direta ou indiretamente responsáveis pelo dano tecidual observada na DECHa. Assim, tem início a fase três da DECHa.

### **3.3) Fase III: Fase efetora da doença com destruição dos tecidos-alvo**

As células T citotóxicas são os principais efetores celulares da DECHa. Três vias citolíticas são importantes na função efetora das células T e de outras células citolíticas: a via perforina/granzima B, a Fas/Fas ligante (FasL) e a injúria mediada diretamente pelas

citocinas. Estudos com camundongos nocaute demonstraram um papel central de cada uma destas vias no estágio efetor da DECHa (GRAUBERT *et al.*, 1997; HATTORI *et al.*, 1998).

O receptor de Fas é um membro da família de receptores de TNF. É expresso em vários tecidos, incluindo nos órgãos-alvo da DECHa, e os níveis de expressão desta molécula aumentam na presença de citocinas pró-inflamatórias durante o processo inflamatório (JAKSCH *et al.*, 2005; WATANABANE *et al.*, 1992). O seu ligante, FasL também pertence a família de TNF e é expresso predominantemente em células T ativadas, macrófagos e neutrófilo.

Já a perforina é expressa principalmente pelas CTL e células NK, e é estocada em grânulos citotóxicos juntamente com as granzimas e outras proteínas. Na presença de cálcio, a perforina polimeriza e forma canais na membrana da célula-alvo, o que permite que a granzima entre nesta célula. Uma vez dentro da célula, a granzima ativa uma cascata de caspases, que levam a célula a apoptose (JAKSCH *et al.*, 2005).

Por outro lado, células T deficientes tanto para perforina quanto para FasL podem induzir a DECHa (SHLOMCHIK, 2007). Isto sugere que outros mediadores atuam promovendo a apoptose celular, tais como TNF e outras citocinas. O TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória que ativa as células dendríticas e aumenta a apresentação de antígenos. Pela indução de quimiocinas inflamatórias, ela recruta células T efetoras, neutrófilos e monócitos para os órgãos-alvo. TNF- $\alpha$  causa, ainda, dano tissular diretamente pela indução de necrose das células-alvo, e ainda pode induzir destruição tecidual através de apoptose (WALL *et al.*, 1994). IL-1 é uma outra citocina inflamatória, secretada pelas células alorreativas, que tem a sua expressão aumentada em pacientes com DECHa (JAKSCH *et al.*, 2005). O seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, porém estudos utilizando antagonistas de IL-1 em modelos de camundongos mostraram que houve uma diminuição da doença (JAKSCH *et al.*, 2005; HANNUM *et al.*, 1990).



Assim, podemos dizer que na fase III, efetora da DECHa, ocorre uma complexa cascata de mediadores celulares. Estes mediadores sinergizam para amplificar a lesão tecidual local e danificar tecidos alvo. O dano no tecido leva a um aumento de sinais inflamatórios, com a liberação de mais citocinas, em um fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas”, perpetuando e aumentando assim o processo da doença entre as fases II e III.

### 1) Características clínicas da DECHa

Clinicamente, as manifestações da DECHa são, basicamente, dermatite, enterite e hepatite e a graduação clínica da doença é obtida de acordo com o grau de comprometimento da pele, volume de diarreia e níveis de bilirrubina encontradas no sangue (JACOBSON & VOGELSANG, 2007).

O estadiamento dos seus órgãos alvo determina, em geral, a severidade da doença. Os graus são classificados como I (brando), II (moderado), III (severo) e IV (muito severo). Um pior prognóstico está associado com os graus III e IV, onde os pacientes apresentam respectivamente 25% e 5% de sobrevida global (JACOBSON & VOGELSANG, 2007).

**Tabela I - Consenso de graduação e extensão dos órgãos envolvidos na DECHa**

INDEX	Pele		Fígado		TGI	
	Estágio	Extensão do rash	Estágio	Bilirrubina (mmol/L)	Estágio	Diarreia (mL/d)
A	1	< 25%	0	< 34	0	< 500
B	2	25% - 50%	1-2	34 -102	1-2	550 - 1500
C	3	> 50%	3	103 - 255	3	> 1500
D	4	Bolhas	4	> 255	4	Dor abdominal severa e paralização do ileo.

a - adaptado do IBMTR, 1997

Fonte: JACOBSON & VOGELSANG, 2007

Dentre os três órgãos de acometimento da DECHa, a pele é um alvo inicial da doença e geralmente o órgão mais comprometido (MARTIN *et al.*, 1990), começando com *rash* pela palma das mãos, planta dos pés, orelhas e mucosa oral. Geralmente os achados na pele, precedem aos achados no fígado e no trato gastrointestinal (HAKAN *et al.*, 2001).

Inicialmente, lesões eritomas são vistas (figura 3-A/B). Em casos mais severos, as manchas se juntam num eritema confluyente e pode haver comprometimento da subepiderme, levando a formação de bolhas (figura 3- C) (VOGELSANG *et al.*, 2003).



pacientes  
Lesões  
ECTHs,  
diagnóstico

diferencial requer correlações clinico-patológicas (MARTIN, 1998). O critério para diagnóstico histológico da DECHA de pele foi estabelecido em 1974 e tem sido utilizado até hoje (LERNER *et al.*, 1974). Basicamente, é caracterizada por vários graus de dano à epiderme: Grau I – vacuolização dos queratinócitos basais; Grau II – vacuolização dos queratinócitos basais e presença de queratinócitos disceratóticos na epiderme; Grau III – fendas focais da camada basal, Grau IV – epiderme totalmente separada da derme.

Outras características histológicas também foram achadas para DECHA na pele como: depleção das células de Langherans, exocitose de linfócitos, degeneração vacuolar dos queratinócitos, edema intercelular, infiltração de linfócitos perivasculares na derme e necrose das células basais. (FERRARA & DEEG, 1991; GOKER *et al.*, 2001). Ao analisar histologicamente a DECHA na pele, é importante saber que o número de linfócitos na epiderme e a quantidade de queratinócitos apoptóticos não é utilizado como preditor da

severidade clínica da doença, a extensão do rash é mais importante e é utilizada como valor preditivo em todos os graus de DECHa (ZHOU *et al*, 2000).

A interpretação dos resultados da biópsia de pele, principalmente na fase inicial após o TCTH, pode ser difícil devido aos achados histológicos similares encontrados com o uso de altas doses de radioterapia e quimioterapia do regime de condicionamento ou tratamento com outras drogas. Entretanto, o valor da biópsia de pele é o principal meio de suporte e confirmação ao diagnóstico clínico de DECHa ou exclusão de outras doenças (HAUSERMANN, 2008).

A DECHa de fígado geralmente inclui o desenvolvimento de icterícia ou um aumento de fosfatase alcalina e bilirrubina no sangue. Também pode ser observado hepatomegalia. No entanto, é frequentemente difícil de distinguir de outras causas de disfunção hepática após o TCTH alogeneico, como a toxicidade de drogas, doença venoclusiva, infecções oportunistas (bacterianas, virais e fúngicas), entre outras complicações. Assim, muitas vezes é necessário a realização de biópsias para confirmar o diagnóstico clínico de DECHa de fígado (GOKER *et al*, 2001). As características histológicas encontradas são: infiltração linfocítica nas áreas portal, pericolangite e destruição das vias biliares.

A manifestação da DECHa no trato gastrointestinal pode se apresentar com náuseas, vômitos, anorexia, diarreia e dor abdominal. É um processo intestinal com lesões focais de intensidade variável. A diarreia pode ser acompanhada com sangramento significativo em resultado da ulceração da mucosa, o que gera um pior prognóstico. Na doença avançada ocorre intensa dor abdominal acompanhada de um grande volume de diarreia. As características histológicas encontradas são ulcerações desiguais, corpos apoptóticos na base das criptas, abscessos da cripta e perda de achatamento da superfície do epitélio (HAUSERMANN, 2008).

O diagnóstico de DECHa é inteiramente baseado em critérios clínicos que podem ser confirmados por biópsia dos seus três órgãos alvo. Dados laboratoriais ou de imagem também

são testes úteis na abordagem de diagnóstico para DECHa. No entanto, uma ferramenta de diagnóstico precoce e preciso que possa prever com segurança a doença antes do seu início, estabelecer um diagnóstico em tempo real e que ajude a distinguir de outras condições que apresentam sintomas semelhantes a DECHa ainda não existe. Por isso, diversos grupos tem buscado potenciais biomarcadores para auxiliar no diagnóstico desta doença.

## **2) A importância da descoberta de biomarcadores de DECHa**

Biomarcador, ou marcador biológico, é em geral uma substância que pode ser utilizada como um indicador de um estado biológico normal, patogênico ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. A heterogeneidade tanto da população de pacientes quanto dos diversos estágios patológicos podem ser mais bem explicados por essas moléculas, uma vez que elas por si só podem indicar um risco de manifestação de determinada doença (LIOTTA *et al.*, 2003).

O uso de biomarcadores em DECHa, pode ser a base para gerar um diagnóstico precoce e acurado, já que uma grande barreira para o tratamento dessa doença é que o seu diagnóstico e prognóstico dependem quase inteiramente da presença de sintomas clínicos e confirmação por biópsias dos órgãos envolvidos. Um biomarcador ideal de diagnóstico da DECHa tem que ser principalmente capaz de distinguir pacientes com a doença de pacientes sem a doença, sendo possível diferenciar de outras reações adversas comuns pós TCTH como infecções e reação a drogas. Ainda, o biomarcador deve (1) refletir especificamente e sensivelmente o estado da doença; (2) não ser invasivo; (3) e ser obtido de forma rápida, simples e padronizada.

Há quase 1 década, a necessidade de buscar um biomarcador para DECHa chamou a atenção dos pesquisadores que começaram a procurar alterações de moléculas em uma abordagem denominada hipótese-dirigida, ou seja, os candidatos a biomarcadores eram escolhidos e testados por causa de seu papel já postulado na patofisiologia da DECHa em

animais e assim estes poderiam servir como alvos a serem possíveis biomarcadores dessa doença em humanos (CHEN & CUTLER, 2012).

Neste tipo de abordagem foram utilizadas as mais diversas metodologias, em diversas fontes fisiológicas como plasma, soro e pele e foram utilizados principalmente a quantificação de moléculas inflamatórias como citocinas e quimiocinas. Um desses estudos foi descrito por Remberger e colaboradores que mostraram que os níveis de citocinas no soro de pacientes com DECHa não podem ser correlacionadas com o quimerismo com o doador, uma vez que estas citocinas encontram-se aumentadas já no pré transplante, tanto no grupo com quimerismo total quanto no grupo com quimerismo misto (REMBERGER *et al.*, 2003). Jaksch e colaboradores, em 2005, observaram um aumento na expressão dos genes dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, e este aumento estava relacionado com o desenvolvimento da DECHa (JAKSCH *et al.*, 2005). Fujji e colaboradores observaram o aumento de IL-5, IL-6 e IL-10 no soro de pacientes com DECHa (FUJJI *et al.*, 2006). Piper e colaboradores, em um estudo um pouco maior que os anteriores, verificaram que existe um papel importante de CXCL10 e CXCR3 na patogenia da DECHa, uma vez que o ligante foi encontrado em altas concentrações no plasma e o receptor teve um aumento de expressão em células mononucleares (PIPER *et al.*, 2007). Neste mesmo trabalho, eles mostraram que essa interação está diretamente relacionada com o recrutamento de células T regulatórias para o sítio da doença.

Algumas desvantagens foram observadas na maioria desses estudos como a utilização de amostras de pacientes de um único centro de estudo, o que limita o pequeno número de amostras e a falta de validação em uma grande coorte. Ainda, por focarem principalmente em moléculas inflamatórias, essas moléculas muitas vezes eram encontradas elevadas nos pacientes mas não por serem específicas da DECHa e sim por estarem participando de um contexto de inflamação generalizada, o que acompanha outras complicações pós transplante.

Assim, outras abordagens a procura de biomarcadores mais apurados se fizeram necessário. Mais recentemente, a abordagem proteômica vem se destacando pois permite analisar o perfil protéico total da amostra utilizada, podendo assim gerar várias moléculas candidatas a biomarcador, sem ter ido à procura de uma molécula específica. Além disso, permite uma análise mais eficiente de um número maior de amostras de forma imparcial, permitindo a identificação de potenciais biomarcadores que não estão previamente envolvidos com a patofisiologia da doença, mas que estão sendo liberados precocemente pelo dano tecidual ao órgãos alvo da doença. Um painel analítico de todas as proteínas e peptídeos presentes ou alterados após o TCTHs pode gerar conhecimentos significantes sobre o desenvolvimento da DECHa.

Com base nisso, tecnologias como espectrometria de massas (MS) com base em proteômica tem permitido estudos em larga escala da expressão proteica em diferentes tecidos e fluidos corporais, em condições e/ou momentos distintos. O recente progresso de metodologias nessa área tem aberto novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre processos normais e anormais que ocorrem no organismo humano (AH GOO & GOODLET, 2010). O proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas (AEBERSOLD & MANN, 2010). Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o *status* fisiológico e as fases da diferenciação celular. Tornando-se assim, uma ferramenta essencial para o estudo da biologia clínica e para entender melhor as doenças humanas.

Diversos grupos tem buscado potenciais biomarcadores de DECHa utilizando ferramentas proteômicas (KAISER *et al*, 2004; SRINIVASAN *et al*, 2006; WEISSINGER *et al*, 2007; HORI *et al*, 2008; MCGUIRK *et al*, 2009; PACZESNY *et al*, 2010). Em relação a fonte fisiológica utilizada, o plasma tem sido amplamente estudado por poder ser obtido de

uma maneira menos invasiva do que as biópsias dos órgãos afetados, além de conter moléculas circulantes sistêmicas e secretadas, que poderão estar alteradas na doença.

Uma vez que a DECHa é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea, fica evidente a importância do estudo desta doença por uma unidade de transplante. Portanto, a identificação e quantificação absoluta de proteínas e peptídeos diferencialmente expressos no plasma de pacientes que desenvolveram DECHa é de extrema importância por representar uma nova estratégia de identificação de biomarcadores auxiliando não só ao diagnóstico precoce e preciso quanto a melhor compreensão da biologia da doença em humanos.

## **Objetivos**

### **1) Objetivo geral**

Identificar potenciais biomarcadores de DECHa no plasma de pacientes submetidos ao TCTH alogeneico no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO – INCA).

### **2) Objetivos específicos**

- 2.1) Comparar o perfil de expressão protéica do plasma de pacientes com DECHa e sem DECHa.
- 2.2) Validar a expressão das proteínas candidatas a biomarcadores.



## **Metodologia**

### **1) Pacientes e amostras**

Foram incluídos neste estudo, pacientes submetidos ao TCTH alogeneico no Centro de Estudos de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA no período de dezembro de 2005 até março 2012. Todos os pacientes foram informados sobre o estudo e aceitaram participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de sangue periférico (Anexo I) e biópsias de pele (Anexo II) Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-INCA) da Instituição (Anexo III).

Neste trabalho foram analisados 31 pacientes com idade entre 06 e 48 anos de idade (20 homens e 11 mulheres). Esses pacientes foram submetidos ao transplante alogeneico de MO, SPM e SCUP, para tratamento da doença de base Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Eles sofreram regimes de condicionamento mieloablativo. Foram coletadas amostras de sangue periférico nos dias D-8, D0 (pré-transplante), D+14, D+28, D+45 (pós-transplante). As amostras de sangue periférico foram processadas para obtenção de plasma, RNA e DNA.

Para a obtenção dos dados clínicos foi realizado o estudo dos prontuários médicos de cada paciente, onde pudemos obter todas as variáveis clínicas biológicas necessárias para este estudo. As informações coletadas foram a doença de base, o tipo de transplante, idade, sexo, fonte de células utilizada para o transplante, HLA do paciente e doador, regime de condicionamento, regime de profilaxia da DECHa, dia de acometimento da DECHa, órgão acometido pela DECHa, estadiamento da DECHa, dia do óbito e causa do óbito. Os dados obtidos podem ser visualizados na tabela abaixo (Tabela II).

**Tabela II: Dados clínicos dos pacientes envolvidos no estudo**

Pacientes	Sexo	Idade	Data TCTH	Fonte de células	Ti													
1	M	45	23/12/2005	MO														
2	F	35	29/06/2006	MO														
3	M	38	18/10/2006	MO														
4	F	31	23/01/2008	SP														
5	M	36	24/01/2008	SP														
6	M	46	01/08/2008	SP														
7	M	41	23/10/2008	MO														
8	M	47	17/12/2008	MO														
9	M	32	27/01/2009	MO														
10	M	12	28/01/2009	MO														
11	M	40	12/11/2008	SP														

**Legenda:** Sexo (M-masculino; F-feminino); Fonte de células (MO- medula óssea; SP- Sangue periférico; SCUP – sangue de cordão umbilical e placentário); Condicionamento (Cy-ciclofosfamida; Bu-bussulfano; TBI-do inglês *total body irradiation* – irradiação corpórea total; ATG- antitimoglobulina); Profilaxia da DEChA (CSA-ciclosporina; MTX-metotrexato; MMF-micofenolato mofetil); Órgão acometido (TGI-trato gastrointestinal)

## **2) Preparação das amostras de plasma**

O sangue periférico foi submetido a centrifugação por 5 minutos a 1400 g a 4°C e o plasma foi transferido para um criotubo, tratado com Inibidor de protease (1uL/mL) e congelado a -70°C, para posterior análise. A quantificação do extrato protéico foi realizado segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1966). Para a verificação da qualidade dos extratos protéicos, cada extrato foi submetido à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## **3) Análise proteômica**

### **3.1) Etapa de concentração e digestão de proteínas**

As amostras de plasma não depletado foram concentradas 16 vezes em colunas de ultrafiltração Amicon de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA, USA). Para isso, as colunas usadas para concentração das amostras foram lavadas com água purificada e posteriormente com NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 200 mM, pH 8,0. As colunas foram então centrifugadas a 4000 g, a 16°C, por 15 min e após a centrifugação foi adicionado volume de amostra contendo 1 mg de proteína e NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM para um volume final de 2 mL. O material foi novamente centrifugado por 1 h a 4000 g a 16°C, e ao final desta etapa, a coluna foi invertida e centrifugada a 1000 g, por 2 min a 16°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente quantificado pelo método de Bradford.

Um total de 200 µg de proteínas da amostra concentrada foi desnaturado pela adição de uma solução de RapiGEST SF 0,1% (Waters, Milford, MA, USA) a 60°C por 15 min, reduzido com ditioneitol (DTT) 10 mM a 60°C por 30 min, alquilado com iodoacetamida 10 mM a temperatura ambiente protegido da luz e digerido enzimaticamente pela adição de tripsina (Promega, Madison, WI, USA) na proporção de 1:50 p/p (enzima:proteína). A digestão foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (Fluka, Buchs, Germany) e ao produto da digestão trípica foi adicionada a enzima álcool desidrogenase de

levedura (ADH; P00330, Waters) na concentração final de 10 fmol/ $\mu$ L como padrão interno para quantificação absoluta (MBEUNKUI & GOSHE, 2011; PANIS *et al.*, 2013).

### **3.2) Condições experimentais das análises de espectrometria de massas utilizando o sistema 2D Nano-ultra performance liquid chromatography (NanoUPLC) tandem nanoESI-HDMS<sup>E</sup>**

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados na Unidade Proteômica do CEMO/INCA utilizando-se o sistema *nanoUPLC tandem nanoESI HDMS<sup>E</sup>* (*Synapt HDMS*, Waters).

Para a primeira dimensão no sistema *nanoACQUITY UPLC* foi utilizada coluna de troca catiônica (SCX, *strong cation exchange*, Waters) com dimensões de 180  $\mu$ m  $\times$  100 mm compactada com *polysulfoethyl aspartamide* 5  $\mu$ m (PolyLC<sup>TM</sup>, Columbia, vMD, USA). Foram analisadas triplicatas técnicas de 3  $\mu$ g de proteína digerida para cada condição experimental. As amostras foram eluídas da coluna de troca catiônica em nove frações utilizando-se um gradiente salino (*plugs* salinos de 2  $\mu$ L contendo formiato de amônio (NH<sub>4</sub>FA) 50, 100, 150 e 200 mM com acetonitrila (ACN) 5%) seguido por gradiente de fase reversa (*plugs* orgânicos de 2  $\mu$ L contendo ACN 10%, 20% e 30 % com NH<sub>4</sub>FA 200 mM e 30% com NH<sub>4</sub>FA 350 mM) e um *flush*. Cada *plug* era adicionado com tampão contendo NH<sub>4</sub>FA 5 mM, pH 3,2, em ACN 5% com fluxo de 3  $\mu$ L/min por 3 min (Silva *et al.* 2005). Os peptídeos eluídos foram capturados em uma coluna de fase reversa (*trap column*, Symmetry C18 5  $\mu$ m, Waters) de dimensões 180  $\mu$ m  $\times$  20 mm. Após a captura de todos os peptídeos, a coluna foi posicionada em linha com outra coluna analítica de fase reversa com dimensões de 100  $\mu$ m  $\times$  100 mm (C18 1,8  $\mu$ m, *nanoACQUITY UPLC HSS T3*, Waters). A segunda dimensão foi realizada com um gradiente de fase reversa de ACN 5% a 40% (v/v) (0,1% v/v ácido fórmico) com um fluxo de 600 nL/min durante 58 min.

Para todas as análises foi utilizada a fonte de ionização *NanoLockSpray* (Waters) operada no modo de íon positivo *nanoESI* (+). O canal *lock mass* foi carregado com amostra a

cada 30 s. O espectrômetro de massas foi calibrado com solução GFP (*[Glu1]-Fibrinopeptide B human solution*, Sigma-Aldrich) com concentração de 100 fmol/mL fornecida também pela fonte NanoLockSpray. O íon duplamente carregado ( $[M + 2H]^{2+} = 785,8426$ ) foi usado para a calibração *singlepoint* (Lteff) inicial e os fragmentos MS/MS do GFP foram utilizados como instrumento final de calibração. Os experimentos de *scanning* do tipo *Multiplexed data-independent* (DIA) com especificidade e seletividade adicionais conferidas pelo uso da tecnologia HDMS<sup>E</sup> foram realizados no espectrômetro de massas *Synapt HDMS* (Waters). As análises foram realizadas no modo *switch* entre MS de baixa energia de colisão (3 eV) e energias de colisão elevadas (12-40 eV) aplicados à célula *T-wave* CID na presença de gás argônio. A transferência a partir da célula de colisão *T-wave* foi ajustada para 1 eV, utilizando o tempo de 1 s em ambas baixa e alta energias, o que forneceu um mínimo de 10 pontos acima dos 10% da capacidade de pico. Os espectros MS<sup>E</sup> obtidos com o analisador *ao-TOF* (*orthogonal acceleration time-of-flight*) abrangeram os valores de *m/z* entre 40 e 2.000. No entanto, o *offset* do analisador quadrupolo foi ajustado de forma que as informações de LC/MS de baixa energia fossem eficientemente obtidas para valores de *m/z* variando entre 400 a 2.000, o que permitiu que todas as massas menores que *m/z* 400 que foram observadas nos espectros LC/MSE fossem oriundas apenas de dissociações ocorridas na célula de colisão do segundo canal de contagem total de íons do espectrômetro de massas. Deste modo, os valores de baixa massa eram sabidamente produtos de fragmentação CID e não de fragmentação na fonte.

### **3.3) Identificação e quantificação de proteínas**

A identificação das proteínas e os dados quantitativos foram gerados pelo uso de algoritmos (Silva *et al.*, 2005) e buscas em bancos de dados específicos para a espécie humana. As bases de dados utilizadas foram randomizadas automaticamente durante as buscas e adicionadas aos bancos de dados originais a fim de permitir a determinação da taxa de falso-positivos das identificações (Geromanos *et al.*, 2011). O processamento dos espectros de

massa obtidos e as buscas nas bases de dados foram realizadas com o servidor *ProteinLynxGlobalServer v.2.5.2* (PLGS) e a ferramenta *Expression E v.2.5.2*. O banco de dados *UniProtKB (release 2011\_11)* com anotações revisadas manualmente foi utilizado e as condições de busca foram baseadas na taxonomia [*Homo sapiens (human)*], máximo permitido de clivagens pela tripsina até 1, modificações variáveis por carbamidometil (C), acetil N-terminal e oxidação (M). As proteínas identificadas com nível de confiança de 95% foram organizadas pelo algoritmo da ferramenta *PLGS Expression E* em uma lista contendo as proteínas e as razões de aumento ou redução de abundância entre as condições analisadas (Com DECHa e sem DECHa.). Foram selecionadas para as análises *in silico* apenas as proteínas diferencialmente expressas com nível de confiança de 95%.

### **3.4) Análise *in silico* dos dados proteômicos**

As análises *in silico* para identificação dos processos biológicos e vias de sinalização impactados pelo conjunto de proteínas diferencialmente expressas foram realizadas utilizando-se os softwares *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA <http://www.ingenuity.com>) e *GeneGO MetaCore* (GeneGO Inc., Encinitas, CA). Foram consideradas significativamente afetados os processos e/ou vias de sinalização com  $p$ -valor < 0,05 calculado pelo *right-tailed Fisher's Exact Test*. Nestas análises o  $p$ -valor indica a probabilidade da associação entre o processo biológico e/ou vias de sinalização e as proteínas ser aleatória. Quanto maior a razão entre o número de proteínas diferencialmente expressas e o número total de proteínas que participam do processo biológico/via metabólica, maior será a significância estatística do resultado e menor será o  $p$ -valor.

#### **4) Avaliação da superexpressão de proteínas candidatas a biomarcadores por Western blot**

As amostras de plasma não depletado foram previamente centrifugadas e o conteúdo de proteínas totais determinados segundo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, adicionou-se volume de amostras correspondente a 30  $\mu$ g de proteínas para separação

por eletroforese em gel de acrilamida a 10% e transferido para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em 5% de leite desnatado e incubadas *overnight* com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados foram. : anti-NALP12 (rabbit IgG anti human- diluição 1:1000 - Abcam).; anti IL1 $\beta$  (mouse IgG1 anti human - diluição 1:500- eBioscience); anti- KNG I ( mouse IgG anti human - diluição 1:500 - Sigma - Aldrich); anti- trombina ( mouse IgG anti human - diluição 1:500 - Santa Cruz Biotechnology)

Na seqüência, as membranas foram lavadas em PBS-*Tween* 0.1% por 30 minutos e incubadas com anticorpo secundário específicos para os anticorpos primários ( donkey anti rabbit IgG-HRP - diluição 1:3000- Santa Cruz Biotechnology ; goat anti mouse IgG-HRP - diluição 1:300 - Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas a temperatura ambiente. A detecção das bandas dos respectivos anticorpos foi realizada através do kit ECL Plus (*GE Healthcare, United Kingdom*). As imagens das bandas foram escaneadas (*Labscan Software, GE Healthcare*) e quantificadas no software *Image J (NIH, USA)*.

### **5) Extração de DNA e RNA das células mononucleares**

O sangue coletado de cada paciente nos diferentes dias foi utilizado para a obtenção das células mononucleares para posterior extração de DNA e RNA. As amostras foram submetidas a uma centrifugação em gradiente de densidade *Ficoll-Hypaque (Sigma)*, na proporção 1:1. O anel celular formado pela centrifugação foi separado, centrifugado e o concentrado de células foi lavado duas vezes com 1 ml de solução de Lise de Hemácias (10mM Tris ph8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl). Após isso, a amostra foi submetida a nova centrifugação e seu sobrenadante descartado. O concentrado de células após a lavagem com a solução de lise de Hemácias foi ressuspenso em 1 mL de Trizol® (*Invitrogen*). A extração do DNA e RNA foi realizada seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e

qualidade do DNA e RNA foram determinadas por espectrofotometria utilizando o aparelho *NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)*.

#### **6) Análise dos níveis de mRNA por PCR em tempo real**

Após a extração, os RNAs das células mononucleares dos pacientes foram incubados com DNase para retirar moléculas de DNA remanescentes da extração do RNA. Para isso, foi utilizado a DNase amplification grade I (*Invitrogen*), segundo instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados utilizando-se 4 ug de RNA, 1 uL de OligodT18 (500ug/mL, *IDT*) em volume final de 10 uL durante 70° por 5 minutos, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 4 uL de 5X RT-buffer, 1 uL de mix de dNTPs (10mM de cada dNTP, *Invitrogen*), 2,4 uL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 uL de Inibidor de RNase (40U/uL, *Invitrogen*) e 1 uL da enzima IMPROM II (*Promega*), incubando por 25°C por 5 minutos e 42°C por 60 minutos. A reação foi inativada mantendo-a durante 15 minutos a 70°C. O cDNA obtido foi misturado com *SYBR Green PCR Master Mix*® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) e com os oligonucleotídeos iniciadores de interesse de acordo com as instruções do fabricante. A análise de qRT-PCR foi realizada no termociclador *ABI Prism 7000* (*Applied Biosystems*) com 45 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os níveis de expressão para cada amostra foram estimados a partir de experimentos em triplicata com os oligonucleotídeos iniciadores alvo e de controle. Para cada amostra, a quantidade de mRNA do gene alvo e do controle interno ( $\beta$ -actina) foram estimados utilizando-se uma curva padrão. A diferença de expressão dos genes entre as condições experimentais foi calculada pelo método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias como o aumento da abundância do mRNA (número de vezes) nas condições com DECHa e sem DECHa.

#### **7) Determinação de nitrito plasmático como estimativa das concentrações plasmáticas de óxido nítrico (NO)**

Este método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes,



com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm.

## **7.1 Processamento das amostras**

### **7.1.1 - Desproteinização**

Para uso no ensaio, as amostras de plasma previamente coletadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um eppendorf, adicionou-se 60µL de amostra, 50µL de ZnSO<sub>4</sub> 75mM (2,156g em 100mL H<sub>2</sub>O deionizada) e, após homogeneização em vórtex (30 segundos), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm a 4<sup>o</sup>C. Em seguida, foram adicionados 70µL de 55mmol/L NaOH (220mg em 100mL H<sub>2</sub>O destilada) e novamente homogeneizado em vórtex por 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm a 4<sup>o</sup>C, com posterior recuperação de 150 µL do sobrenadante, adicionando-se 50µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7 (4,5g em 100mL H<sub>2</sub>O destilada).

### **7.1.2- Ativação dos grânulos de cádmio**

Os grânulos de cádmio estocados em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100mM foram lavados com H<sub>2</sub>O destilada três vezes e, após, deixados em contato com tampão CuSO<sub>4</sub> 5mM (124,84mg em 100mL tampão glicina-NaOH 15g/L pH 9,7) por 5 min (os grânulos de cádmio ativos foram utilizados dentro de 10 min e os grânulos de cádmio que ficaram pretos após serem lavados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram descartados).

### **7.1.3- Redução de nitrato a nitrito**

Foram adicionados 400 mg de grânulos de cádmio ativados ao sobrenadante recuperado em tampão, deixando a mistura sob agitação contínua por 10 min. Após este tempo, as amostras foram transferidas para outro tubo, para determinação de nitrito por meio da reação de Griess.

#### **7.1.4 Preparo da curva padrão**

Solução estoque de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_2$  100mM (6,9mg em 10mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) foram preparadas no momento do uso e diluídas seriadamente até 7,8  $\mu\text{M}$  na microplaca.

#### **7.1.5 Reação de Griess**

Para cada ponto da curva e amostra, foi feita a seguinte reação, em triplicata: para cada poço, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de amostra + 50  $\mu\text{L}$  de Reagente de Griess (Sulfanilamida: 0,4 g sulfanilamida em 20mL Ácido Fosfórico 5% - proteger da luz; NEED: 40mg em 20mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada – protegido da luz). Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, e medida sua absorbância a 550 nm em leitor de microplaca.

### **8) Experimentos de Imunohistoquímica**

#### **8.1) Coleta de biópsia de pele**

Os pacientes foram submetidos à biópsias de pele nos dias -8 e 0 pré-transplante e +14, +28 e +100 pós-transplante. As biópsias foram realizadas pela Dra. Marcia Mattos. Se por acaso ele foi diagnosticado clinicamente com DECH aguda em um dia diferente desses pré-determinados, uma nova biópsia foi coletada no mesmo dia do diagnóstico. As biópsias foram retiradas da região do abdomen dos pacientes. Entretanto, se o paciente desenvolveu DECHa, a biópsia de pele foi retirada do local da lesão da doença. Todas as biópsias foram colocadas em formol e encaminhadas ao DIPAT (Departamento de Patologia do INCA) para confirmação ou não da doença. Como controle utilizamos pele de doador saudável.

#### **8.2) Diagnóstico histológico da DECHa**

Para visualização histológica, fragmentos dos órgãos foram fixados, desidratados por diferentes concentrações de etanol, clarificados por xilol, e incluídos em parafina. Em seguida, o material parafinado foi cortado em micrótomo e os cortes desparafinados foram

rehidratados e corados com hematoxilina-eosina. A análise foi feita por microscopia óptica convencional, por uma dermatopatologista especialmente engajada neste estudo.

### 8.3) Imunohistoquímica

As biópsias de pele dos pacientes submetidos ao TCTH alogeneico e do controle de pele saudável foram analisadas por imunohistoquímica com o kit. Este kit utiliza o método de reconhecimento por conjugação de biotina com streptavidina, usamos a revelação por DAB e contra-coloração por hematoxilina.

Em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina foram aplicados cortes histológicos de 4µm de espessura. Após a completa aderência do corte à lâmina, este foi aquecido a 60°C em estufa seca e desparafinado com lavagens sucessivas de xilol, re-hidratado com banhos sucessivos com etanol (100%, 95%, 90%, 80% e 70%) e H<sub>2</sub>O destilada. Após a re-hidratação dos cortes, estes foram bloqueados para peroxidase endógena com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min., lavados com PBS 1X por 5 min., incubados com soro fetal bovino 5% por 5 min. para bloqueio de ligações inespecíficas e incubadas com o anticorpo primário *overnight* em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-NALP12 (rabbit IgG anti human- diluição 1:1000 - Abcam).

Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados com PBS 1X por 2 vezes, 5min. cada, incubados com anticorpo secundário biotinilado por 1 hora, e lavados novamente por 2 vezes 5 min. cada. Após o término das lavagens, os cortes foram incubados com a streptavidina por 20 min, lavados com PBS 1X e revelados com DAB. Após a revelação, foram lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina por 10 seg., lavados em água corrente e desidratados em lavagens seriadas de etanol (70%, 80% 90%, 100% 2x) e 2 lavagens com xilol. Após a desidratação as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e lamínula para análise em microscópio ótico.

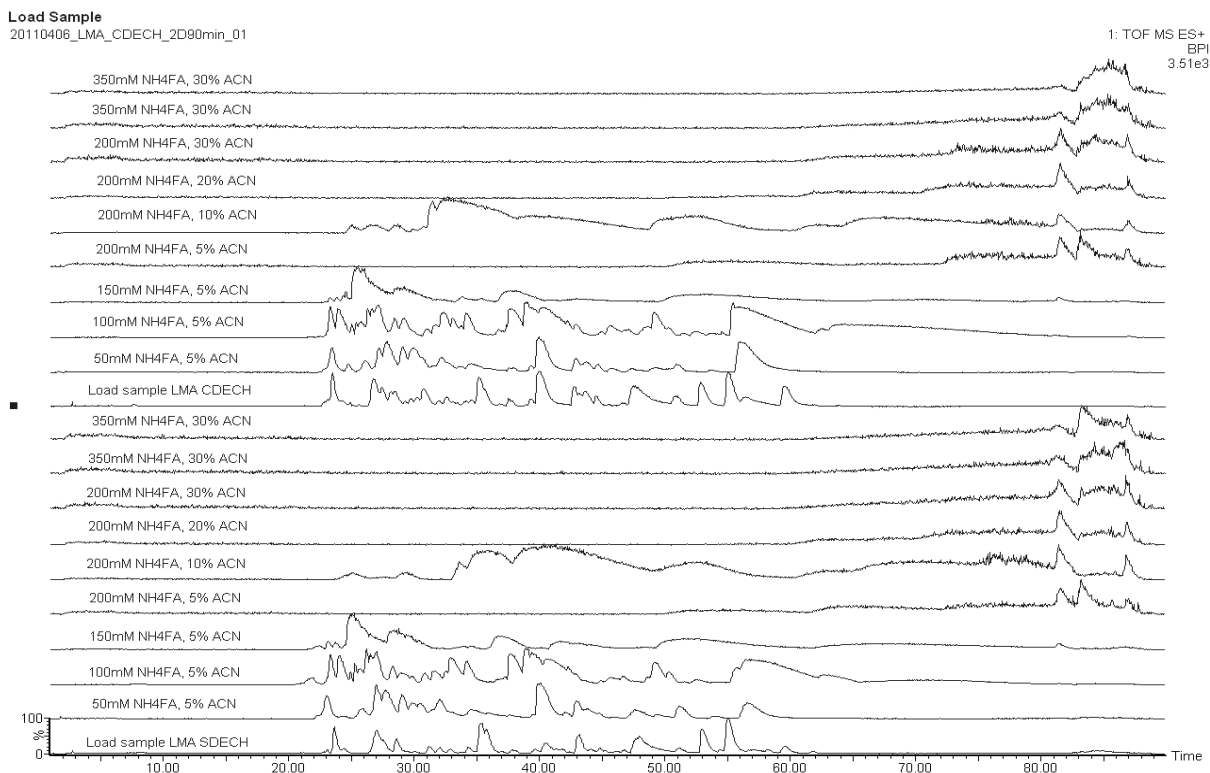
## **Resultados**

### **1) Análise proteômica por cromatografia líquida multidimensional MudPiTT**

Nos últimos anos, o desenvolvimento de modernas tecnologias possibilitou novas abordagens para o estudo de proteínas e vias de sinalização que são capazes de fornecer uma visão global do fenômeno em estudo. Este é o caso da espectrometria de massas aplicada à análise proteômica. Os modernos espectrômetros de massas atualmente disponíveis permitem a ampla caracterização de eventos de sinalização e podem ser utilizados em estudos de expressão proteica, investigação de modificações pós-traducionais e interações entre proteínas. Este tipo de abordagem permite obter informação precisa sobre mudanças quantitativas ocasionadas por perturbações em milhares de proteínas (Choudhary & Mann, 2010).

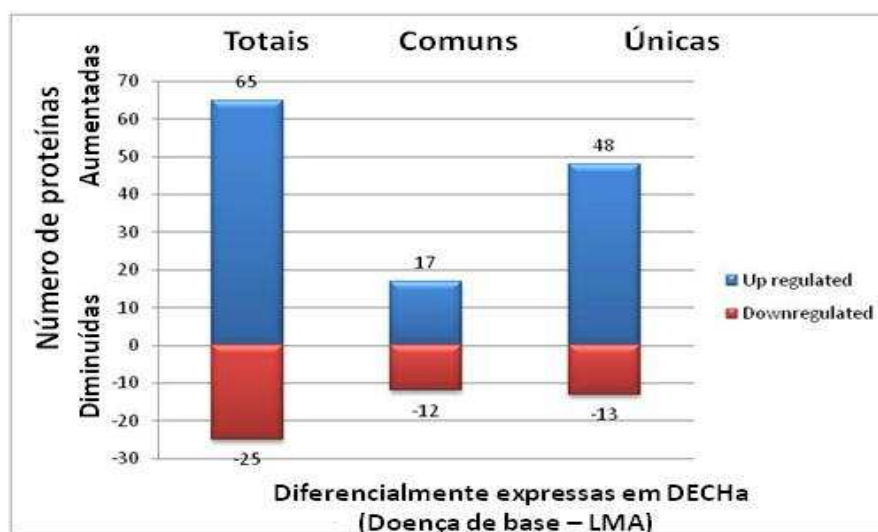
Sendo assim, fomos verificar as proteínas que se encontravam diferencialmente expressas no plasma dos pacientes com DECHa. Para isso utilizamos a análise comparativa entre o Pool dos pacientes que desenvolveram DECHa com os que não desenvolveram DECHa.

A figura 4 mostra que a distribuição cromatográfica bidimensional dos peptídeos separados no sistema *nanoACQUITY UPLC* é semelhante em ambas as condições experimentais, o que indica a qualidade das separações e a sua reprodutibilidade.



**Figura 4:** Distribuição cromatográfica bidimensional dos peptídeos obtida com o sistema *nanoACQUITY UPLC* realizada em triplicata para as condições experimentais Pool de pacientes com DECHa e Pool de pacientes sem DECHa.

A análise proteômica aplicada neste estudo resultou na identificação de 160 proteínas, 65 proteínas apresentaram expressão aumentada e 25 apresentaram expressão diminuída nos pacientes com DECHa em relação aos pacientes sem DECHa. Das 65 proteínas que apresentaram sua expressão aumentada, 17 são comuns aos dois grupos analisados e 48 são únicas do Pool de pacientes com DECHa (Gráfico 1). O Anexo IV apresenta a lista completa das proteínas, considerando-se o nível de confiança de 95%.



**Gráfico 01:** Proteínas diferencialmente expressas no plasma de pacientes com LMA submetidos ao TCTH alogeneico que apresentaram DECHa e que não apresentaram DECHa

A fim de observarmos os principais processos biológicos nos quais as proteínas diferencialmente expressas nos pacientes que desenvolveram DECHa estão envolvidas, realizamos a análise *in silico* dessas proteínas.

## 2) Processos biológicos e vias de sinalização envolvendo as proteínas diferencialmente expressas no plasma dos pacientes com DECHa

Todas as proteínas diferencialmente expressas, aumentadas ou reduzidas, foram analisadas em conjunto utilizando o *software* MetaCore. A Figura 5 apresenta os processos biológicos mais significantes para o conjunto de proteínas diferencialmente expressas de acordo com os resultados da análise *in silico*.

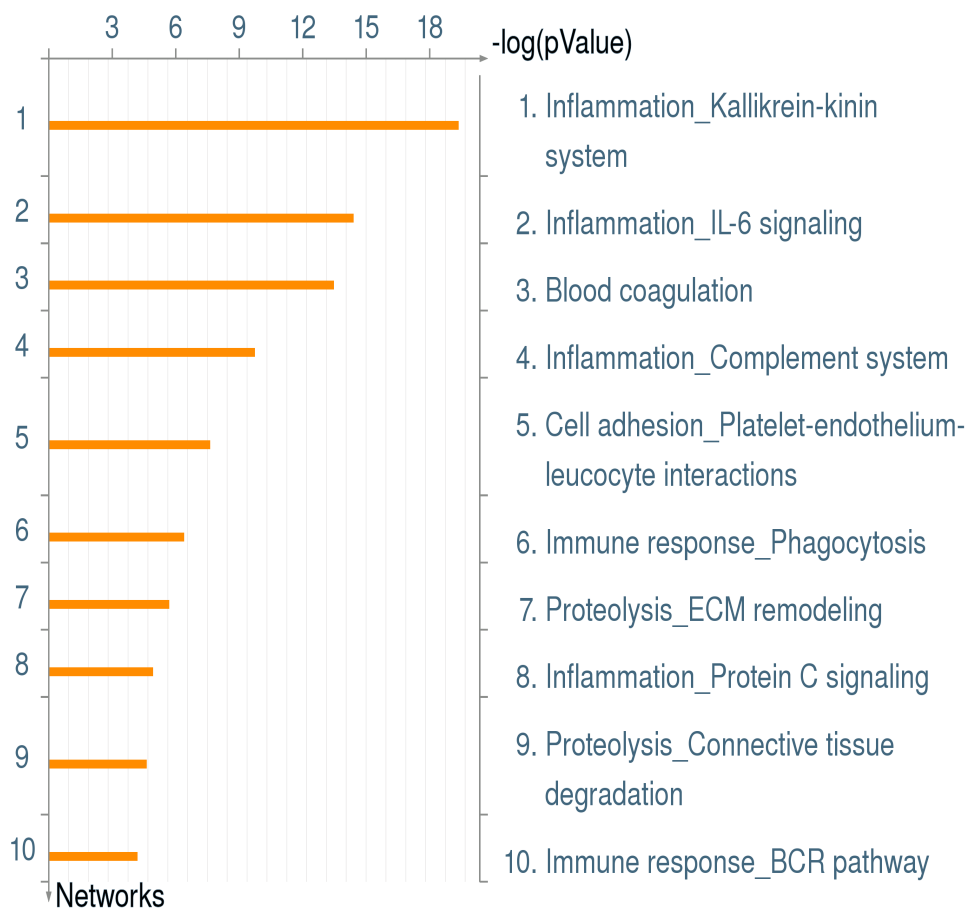


**Figura 5:** Processos biológicos impactados nos pacientes com DECHa. Resultados obtidos através do *software* MetaCore.

Dentre os principais processos biológicos presentes nos pacientes com DECHa, destacam-se processos envolvendo coagulação sanguínea, vasodilatação, resposta ao sistema imune, remodelamento e reparo de tecidos e regulação do estresse oxidativo.

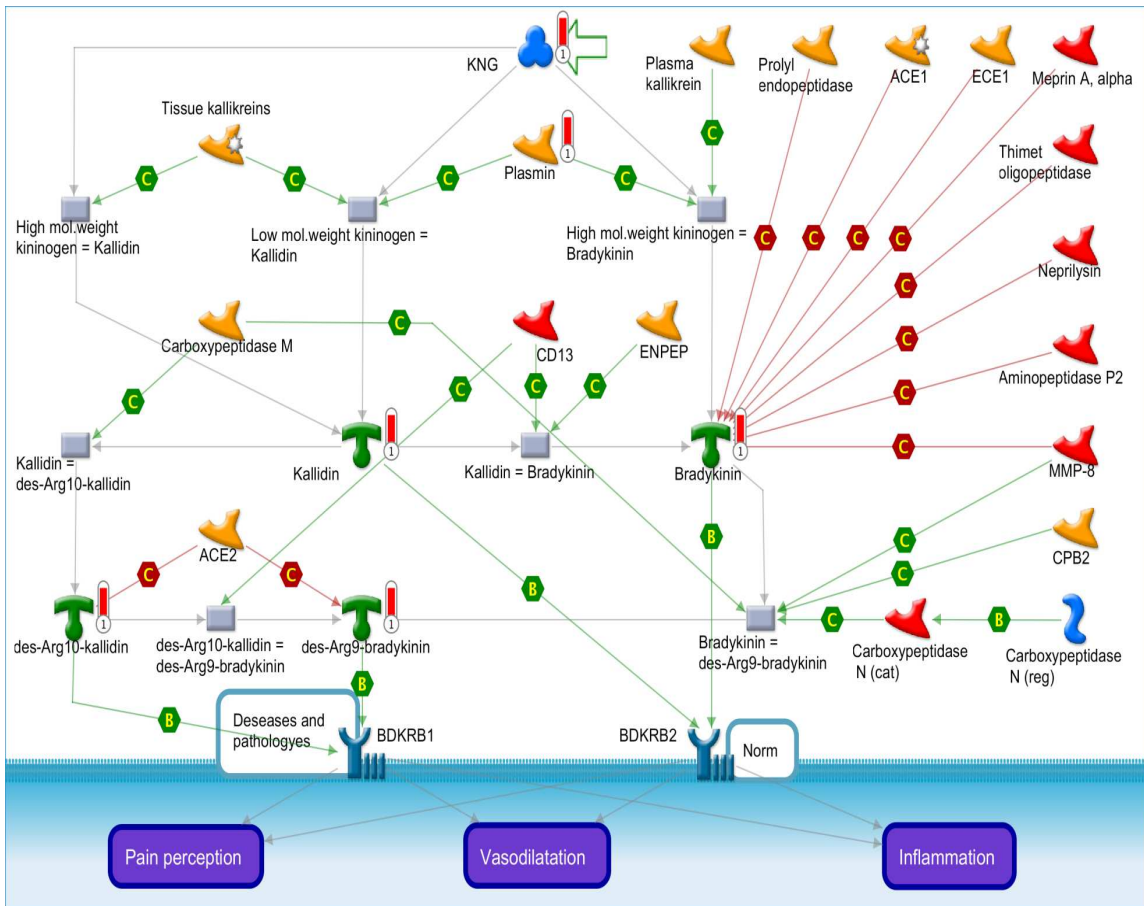
As análises *in silico* revelaram ainda as vias de sinalização que estariam sendo estimuladas pelas proteínas diferencialmente expressas no plasma dos pacientes com DECHa. Como esperado, as vias que receberam destaque nesses pacientes foram vias relacionadas à inflamação. Foram encontradas vias de sinalização inflamatórias mediadas pelo sistema calicreína-cinina, via da citocina IL-6 e sistema complemento. Correlacionando com os achados nos processos biológicos, a via da coagulação sanguínea também mostrou-se alterada nos pacientes com DECHa.



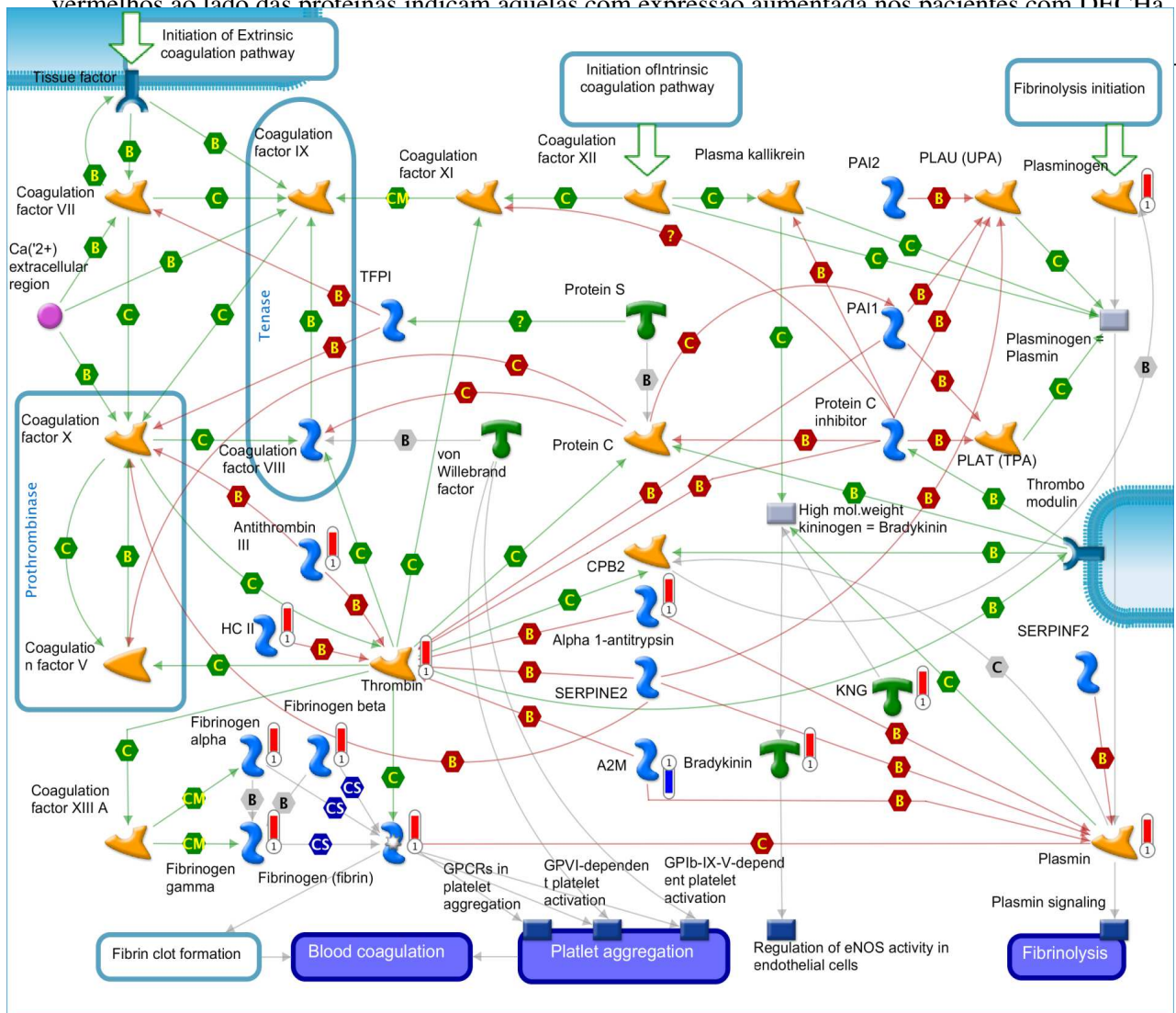










**Figura 6:** Principais vias de sinalização alteradas nos pacientes com DECHA. Resultados obtidos através do *software* MetaCore.

Dentre as diversas vias de sinalização relacionadas a processos inflamatórios encontradas alteradas nos pacientes com DECHA, destacamos a via caliceína- cinina. A figura 6 fornecida pelo *software* Metacore demonstra o aumento de proteínas importantes dessa via como cininogênio, plasmina e bradicinina.



**Figura 7 :** Via do sistema caliceína-cinina construída com o *software* MetaCore. Os termômetros vermelhos ao lado das proteínas indicam aquelas com expressão aumentada nos pacientes com DECHA.



**Figura 8:** Via da coagulação sanguínea construída com o *software* MetaCore. Os termômetros vermelhos ao lado das proteínas indicam aquelas com expressão aumentada nos pacientes com DECHA e os termômetros azuis indicam aquelas com expressão diminuída.  - proteína;  -protease;  -metaloproteinase;  -proteína ligante;  -receptor;  - efeito positivo;  -efeito negativo;  -reação.

Na figura 8 observamos também que a via da coagulação sanguínea aparece como sendo regulada por uma isforma de sintase do óxido nítrico (NO), a eNOS (sintase endotelial do óxido nítrico). O óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase, a qual possui 3 isoformas: neuronal, induzível e endotelial (eNOS). Além de ser um potente vasodilatador, o NO exerce importante papel no controle da agregação plaquetária, resistência e crescimento vascular. Na coagulação sanguínea, o NO está envolvido com a cascata fibrinolítica e trombótica associados com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária (ZHANG *et al*, 2006).

A fim de avaliarmos a possível indução do óxido nítrico nas vias de sinalização descritas como alteradas nos pacientes com DECHa, realizamos a estimativa da dosagem de óxido nítrico no plasma dos pacientes com DECHa.

### **3) Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico no plasma dos pacientes com DECHa**

O óxido nítrico é uma molécula lipossolúvel, gasosa e com um tempo de meia-vida de poucos segundos (ZHANG *et al.*, 2006). Essa molécula pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (KAVAKLI *et al.*, 2004). Sendo assim, avaliamos a determinação de nitrito plasmático como estimativa das concentrações plasmáticas de óxido nítrico (NO) através do método de Griess.

Para isso, analisamos os níveis de nitrito no plasma do dia D+45 de 21 pacientes com DECHa, 11 pacientes sem DECHa e que tinham como doença de base Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e 10 pacientes com DECHa e 9 pacientes sem DECHa que tinham como doença de base Síndrome Mielodisplásica (SMD).

**Gráfico 2:** Gráfico representando os níveis de dosagem nitrito plasmático como estimativa das concentrações plasmáticas de óxido nítrico (NO) através do método de Griess nos pacientes com DECHa e sem DECHa no dia D+45 que tinham como doença de base LMA e SMD.

O gráfico 2 demonstra que grupo de pacientes com DECHa e que tinham LMA como doença de base apresentam maiores concentrações de nitrito no plasma, tanto comparado com o grupo de pacientes sem DECHa, quanto comparado com os pacientes que tinham SMD como doença de base.

Este resultado corrobora com as análises *in silico*, que mostraram a via da coagulação sanguínea sendo regulada por uma isforma de sintase do óxido nítrico (NO) nos pacientes com DECHa que tinham LMA como doença de base.

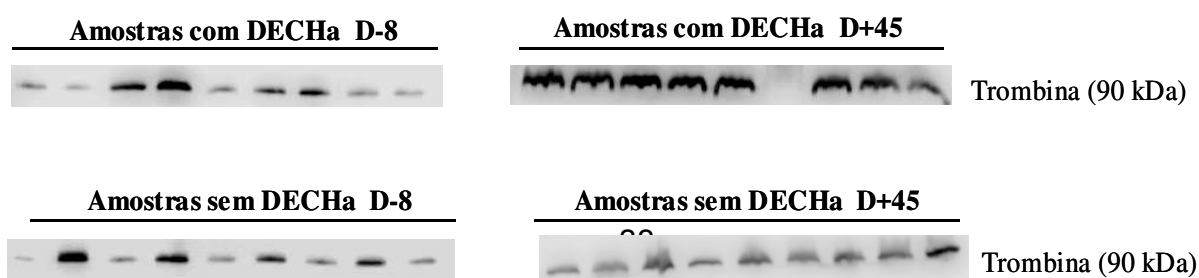
#### 4) Validação de proteínas envolvidas nas vias de coagulação sanguínea e do sistema caliceína-cinina

É interessante notar que a maioria das vias de sinalizações encontradas alteradas nos pacientes com DECHa possuem funções que interagem entre si e com os principais processos biológicos envolvidos. A fim de confirmarmos o aumento da expressão de proteínas presentes nesses processos biológicos, validamos a expressão de algumas dessas proteínas por western blot no plasma dos pacientes.

### Gráfico 1: Dosagem de Óxido Nítrico no plasma de pacientes com DECHa e sem DECHa no dia D+45 que tinham como doença de base LMA e

em relação a via da coagulação sanguínea, a proteína trombina foi escolhida para os experimentos de validação por representar uma proteína chave da via da coagulação sanguínea onde sua principal função é converter fibrinogênio em fibrina (proteína filamentar).

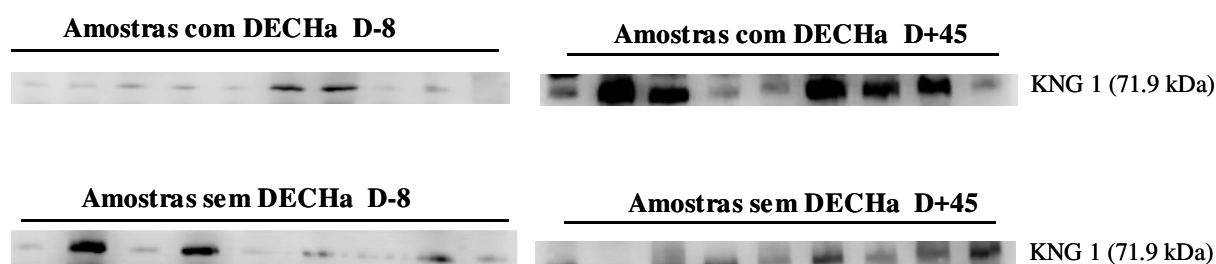
A validação da proteína trombina foi realizada no plasma do dia D-8 (antes do TCTH) e no dia D+45 de 21 pacientes com DECHa e 11 sem DECHa que tinham LMA como doença de base. As análises foram realizadas em amostras individuais dos pacientes (Figura 9).



**Figura 9:** Validação por Western blot da proteína Trombina. As análises foram realizadas em amostras de plasma individuais dos pacientes nos dias D-8 e D+45.

Como podemos observar na figura 9, os pacientes com DECHa D+45 apresentam maior expressão de trombina. As amostras dos dias D-8 (com DECHa e sem DECHa) e no dia D+45 (sem DECHa) apresentaram níveis basais de expressão da proteína.

O cininogênio (*Kininogen I* – KNG I) é uma glicoproteína precursora das cininas. Essa proteína é constituinte tanto do sistema de coagulação sanguínea quanto do sistema calicreína-cinina, conforme mostrado nas figuras 7 e 8. Por isso, também fomos avaliar o aumento de sua expressão, utilizando o mesmo modelo experimental que foi utilizado para validação da trombina.



**Figura 10:** Validação por Western blot da proteína cininogênio I. As análises foram realizadas em amostras de plasma individuais dos pacientes nos dias D-8 e D+45.

Assim como foi observado na validação da proteína trombina, os pacientes com DECHa D+45 também apresentam maior expressão de cininogênio I. As amostras dos dias D-

8 (com DECHa e sem DECHa) e no dia D+45 (sem DECHa) também apresentaram níveis basais de expressão da proteína.

Com esses resultados podemos confirmar que as principais proteínas do sistema de coagulação sanguínea e do sistema caliceína-cinina encontram-se aumentadas nos pacientes com DECHa contribuindo para que esses processos estejam alterados nesses pacientes.

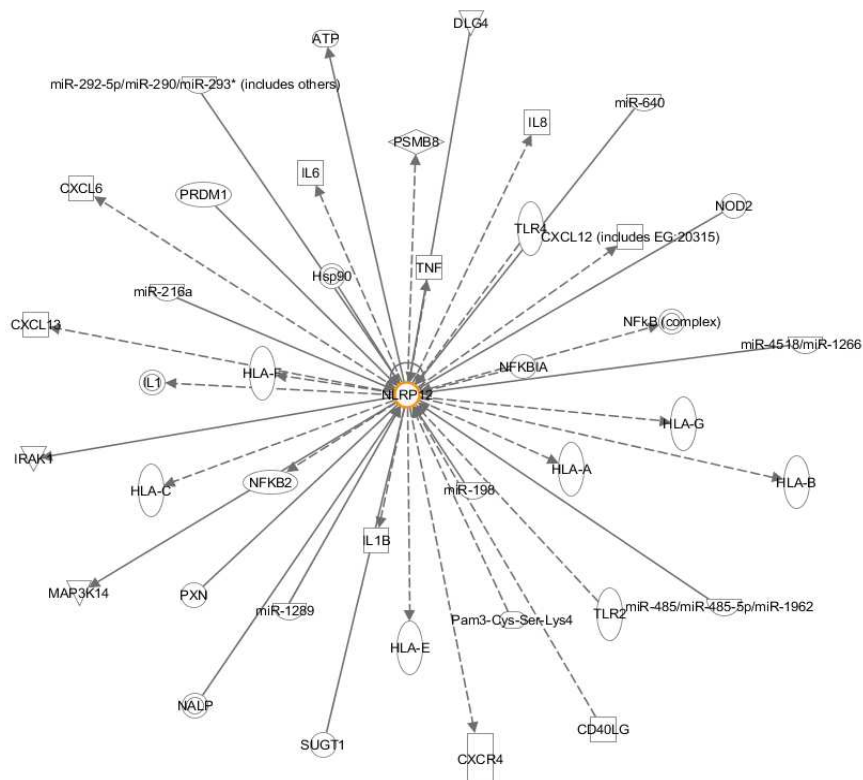
#### **4) Identificação da proteína NALP12 como biomarcador circulante de DECHa**

Ao observarmos individualmente as proteínas identificadas nos pacientes com DECHa, nota-se uma prevalência na expressão de proteínas normalmente encontradas no plasma sanguíneo como apolipoproteínas, diferentes isoformas de imunoglobulinas, transferrinas e inter-alfa tripsinas. Entretanto, o aumento da proteína NALP12, também conhecida como Monarch-1/PYPAF7 nos chamou atenção por não ser uma proteína comum de estar presente no plasma, além de estar envolvida em processos inflamatórios importantes e aparecer superexpressa nos pacientes com a doença.

A NALP12 é uma proteína que participa da ativação de caspases pró-inflamatórias (CASP1) através de sua interação com complexos multiprotéicos chamado inflamossomo. O inflamossomo são complexos citosólicos que estimulam a autocatálise da pró-caspase 1 (CASP1) e promove o processamento de diferentes citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18 em sua forma ativa. NALP12 também atua na ativação da via de sinalização Nuclear factor-kB (NF-kB), uma importante via relacionada a fatores de transcrição que controlam a expressão de genes envolvidos em respostas imunes, apoptose e ciclo celular. A regulação incorreta de NF-B pode causar doenças inflamatórias e autoimunes (Tschopp *et al*, 2003).

A fim de se verificar os prováveis parceiros, direta e/ou indiretamente, da proteína NALP12, foi feita a análise do interatoma das mesmas através do banco de dados *Ingenuity*. O *Ingenuity* é um navegador online que permite a exploração de interações protéicas conhecidas

e preditas. As interações conhecidas consistem em interações descritas na literatura (Base de dados de referência proteica humana) (RUAL *et al.*, 2005; STELZL *et al.*, 2005).



**Figura 11:** Mapa de interação da proteína NALP12

O interatoma de NALP12 (figura 11) mostra a interação com diversas citocinas, quimiocinas e várias moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) mostrando sua importância no contexto da fisiologia da DECHA e do TCTH alógeno.

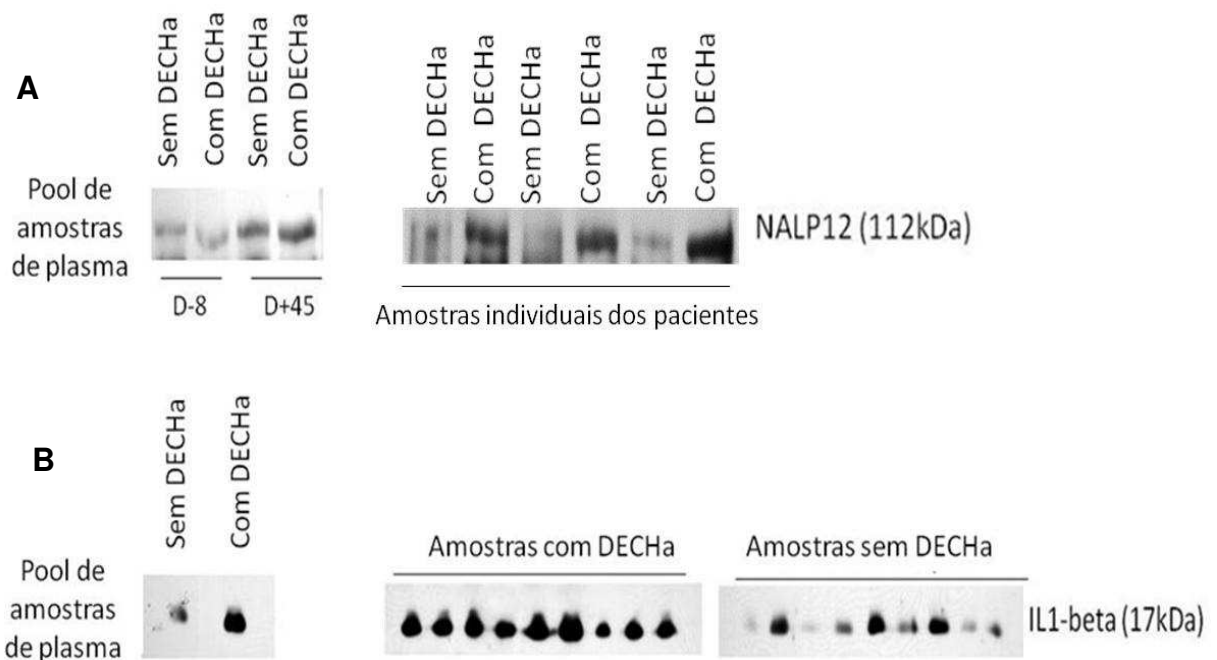
A fim de confirmarmos a expressão diferencial da proteína NALP12 nos pacientes com DECHA e seu possível papel como biomarcador da doença, validamos sua expressão por Western Blot no plasma, analisamos o seu perfil de expressão em biópsias de pele e avaliamos os níveis de mRNA do gene NLRP12

### **5) Validação da superexpressão da proteína NALP12 e do complexo inflamossomo no plasma dos pacientes com DECHA**



Os experimentos de validação foram realizados utilizando plasma sanguíneo de 20 pacientes com DECHa e 11 pacientes sem DECHa. Primeiramente, realizamos análise comparativa utilizando Pool de amostras de pacientes com DECHa e sem DECHa no dia D-8 e D+45. Como demonstrado na figura 12, observamos que não há diferença de expressão da proteína no dia D-8 entre os dois grupos de pacientes. Em relação ao dia D+45 há um discreto aumento da expressão de NALP12 nos pacientes com DECHa. Entretanto, quando realizamos análise individual dos pacientes no dia D+45, observa-se que os pacientes com DECHa possuem maior expressão de NALP12 do que os pacientes sem DECHa, corroborando com os dados encontrados na análise proteômica.

A proteína NALP12 está relacionada com a ativação de caspases pró inflamatórias e faz parte de um complexo multiproteico chamado inflamossomo no qual sua principal função é processar a citocina pró IL-1 $\beta$  em sua forma ativa. Com o intuito de verificarmos se o complexo inflamossoma está ativado nos pacientes com DECHa, avaliamos a expressão da citocina IL1  $\beta$  no plasma dos pacientes. Para isso, realizamos novamente a análise comparativa em Pool de pacientes com DECHa e sem DECHa no dia D+45, que demonstrou que pacientes com DECHa possuem maior expressão de IL1  $\beta$ , o mesmo se confirmou quando analisamos os pacientes individualmente. Esses dados confirmam que o complexo inflamossoma encontra-se ativado nos pacientes com DECHa no dia D+45 pós transplante.



**Figura 12:** Validação por Western blot da proteína NALP12 (A) e da citocina IL-1 beta (B) no plasma . As análises foram realizadas em amostras individuais e em Pool dos pacientes com DECHa e sem DECHa no dia D+45.

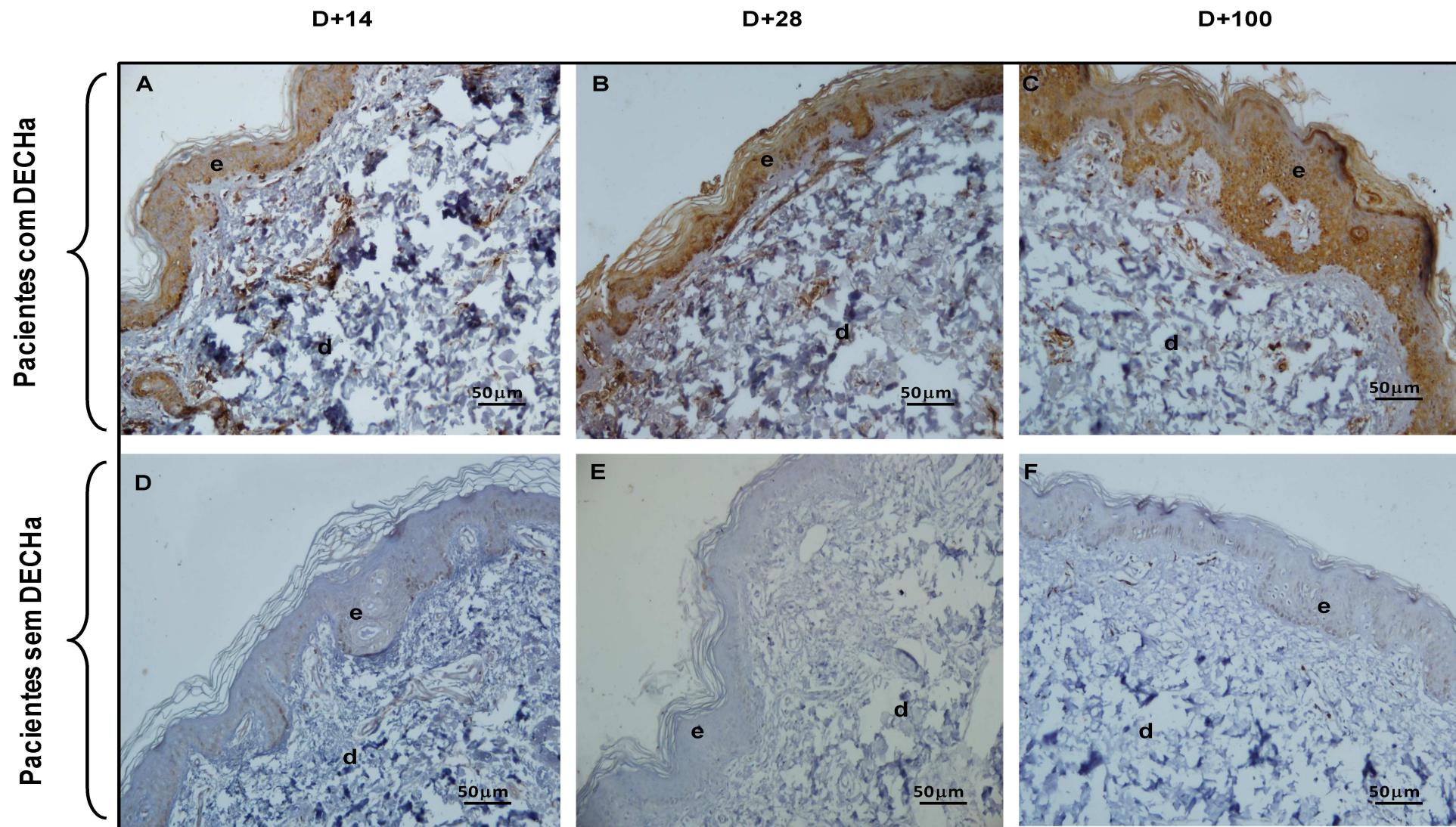
### **7) Análise do perfil de expressão da proteína NALP12 em biópsias de pele de pacientes com DECHa**

Tendo como base que a pele é um alvo inicial da DECHa e geralmente o órgão mais comprometido (MARTIN *et al.*, 1990), avaliamos o perfil de expressão da proteína NALP12 em biópsias de pele de 10 pacientes (6 com DECHa e 4 sem DECHa) a fim de elucidarmos se a proteína estaria presente apenas circulante no plasma ou também no órgão acometido pela doença.

Como estratégia de análise, avaliamos o perfil de expressão da proteína em diferentes dias pós transplante (D+14, D+28,D+100), de acordo com o dia mais próximo de acometimento da DECHa. Conforme mostrado na figura 13, o paciente 4 obteve diagnóstico de DECHa no dia D+16 (A), paciente 5 no dia D+28 (B) e o paciente no dia D+105. Esses pacientes possuem maior expressão de NALP12 do que os pacientes sem DECHa (23 (D), 24 (E) e 26 (F)).

A marcação positiva para NALP12 encontra-se predominantemente na região da epiderme.





**Figura 13** – Imunohistoquímica de cortes histológicos de biópsias de pele do paciente 4 com DECHa no dia D+16 (A), paciente 5 com DECHa no dia D+28 (B) e do paciente com DECHa no dia D+105) e dos pacientes sem DECHa 23 (D), 24 (E) e 26 (F). Todos em aumento de 20X. (e-epiderme/d-derme)



## Discussão

Atualmente, o diagnóstico da DECHa é baseado principalmente em parâmetros clínicos-laboratoriais, tais como erupções na pele, diarreia, elevação dos níveis séricos de enzimas hepáticas, entre outros sintomas (PRZEPIORKA *et al.*, 1995). O diagnóstico diferencial depende de biópsias de órgãos para distinguir a DECHa de outras complicações comuns que se apresentam com sintomas clínicos semelhantes (por exemplo, efeitos secundários induzidos por medicação). O uso de biomarcadores podem ter potencial para melhorar o diagnóstico precoce e preciso da DECHa e outras complicações do TCTH, sem a necessidade de procedimentos invasivos, tais como biópsias (LIOTTA *et al.*, 2003).

Através da contínua evolução das tecnologias proteômicas nos últimos anos, biomarcadores protéicos tem sido identificados e validados sendo descritos como ferramentas promissoras para facilitar o diagnóstico e prognóstico da DECHa. Ao contrário do genoma, o proteoma varia com o tempo e define-se como o conjunto de proteínas presentes em uma amostra de um certo ponto do tempo. Assim, proteínas representam biomarcadores ideais na configuração do cenário pós transplante. Testes clínicos ideais são baseados na coleta de amostra de forma não invasiva, o que pode permitir a coleta de amostra repetitiva de um mesmo paciente em um curto espaço de tempo. Dessa forma, o plasma sanguíneo ganha destaque por ser uma fonte biológica importante onde apresenta um somatório de vários eventos diferentes, desde proteínas secretadas pelos órgãos afetados da DECHa como proteínas que refletem alterações sistêmicas gerais.

Diversos estudos identificaram o perfil proteômico de DECH aguda utilizando várias fontes biológicas (KAISER *et al.*, 2004; SRINIVASAN *et al.*, 2006, IMANGULI *et al.*, 2007, WEISSINGER *et al.*, 2007). Imanguli e colaboradores caracterizaram o perfil proteômico da saliva de 41 pacientes submetidos ao TCTH, eles destacaram as proteínas lactoferrina e inibidor de protease de leucócitos aumentadas nos pacientes com DECHa em até seis meses pós TCTH ( IMANGULI *et al.*, 2007). Hori e colaboradores (HORI *et al.*, 2008)

realizaram análise do plasma em modelo murino a fim de encontrar proteínas específicas para DECHa. Eles destacaram a citocina CCL8 como sendo um marcador específico de diagnóstico de DECHa.

Um estudo iniciado em 2004 tentou identificar possíveis perfis protéicos que pudessem estar relacionados com a DECHa, comparando a urina de pacientes submetidos ao TCTH com e sem DECHa (KAISER *et al.*, 2004; WEISSINGER *et al.*, 2007). Eles identificaram fragmentos de colágeno  $\alpha$ -1 na urina de pacientes com DECHa.

Srinivasan e colaboradores observaram perfis protéicos diferentes no plasma de pacientes com DECHa, quando este perfil foi comparado com o perfil protéico do plasma destes mesmos pacientes no pré transplante, porém não identificaram nenhuma proteína específica (SRINIVASAN *et al.*, 2006). Em 2009, Paczesny e colaboradores identificaram um painel de biomarcadores no plasma de pacientes com DECHa (PACZESNY *et al.*, 2009). Neste trabalho, eles determinaram um painel de quatro proteínas (receptor de IL-2, receptor de TNF, IL-8 e HGF) que podem ser encontradas em 85% dos pacientes que não tiveram maiores complicações no pós transplante. Para chegar a estas quatro proteínas, eles utilizaram a metodologia de microarranjos de anticorpos para 120 proteínas inflamatórias.

Em um trabalho posterior, este mesmo grupo encontrou um biomarcador para a DECHa de pele, a elafina, um inibidor de proteinase epidermal induzida por TNF- $\alpha$  (PACZESNY *et al.*, 2009). Neste caso eles utilizaram um *pool* de plasma de 10 pacientes com DECHa de pele e compararam com 10 que não desenvolveram DECHa e observaram que nos pacientes com DECH de pele, a concentração desta proteína estava 2 vezes aumentada no plasma em relação aos pacientes que não desenvolveram a doença.

Utilizando essa mesma estratégia, Ferrara *et al.*, 2011 comparou o perfil proteômico do *pool* de plasma de 10 pacientes que foram acometidos com DECHa de trato gastrointestinal com 10 pacientes que não foram acometidos. Foram encontradas 74 proteínas aumentadas nos pacientes com a doença, sendo cinco de origem gastrointestinal

(carboxipeptidase, inibidor de tripsina pancreática, paladina, litostatina e *regeneração ilhota* derivado de proteína 3- *alfa-REG3 alfa*). Essas proteínas foram validadas em 1014 pacientes e REG3 alfa, uma proteína que atua na proteção da mucosa intestinal, foi a que se mostrou em maior concentração nos pacientes com DECHa (3 vezes mais) do que as outras proteínas. Esses dados demonstram que biomarcadores de doenças que acometem tecidos específicos como é o caso da DECHa, podem ser detectadas no plasma sanguíneo.

Em nosso estudo, identificamos 71 proteínas alteradas no plasma dos pacientes que desenvolveram DECHa e que tinham como doença de base LMA (48 com a expressão aumentada e 13 com a expressão diminuída). As análises *in silico* demonstraram que os principais processos biológicos que se destacaram nesses pacientes foram coagulação sanguínea, vasodilatação e resposta imune, mais especificadamente as vias de sinalização do sistema calicreína-cinina, mediada pelo aumento das proteínas cininogênio, plasmina e bradicinina e da coagulação sanguínea, mediada pelo aumento de expressão das proteínas plasminogênios, fibrinogênios e trombinas.

O sistema calicreína-cinina é composto de pró-calicreínas, calicreínas (tecidual e plasmática), cininogênios, cininas, cininases e enzimas conversoras de cininas. A bradicinina é um nonapeptídeo que exerce suas ações, em concentração nanomolar, após interagir com receptores específicos da membrana plasmática de células-alvo. Entre as principais ações fisiológicas da bradicinina está sua participação nos mecanismos de controle do tônus vascular e participa da vasodilatação. A ação vasodilatadora arterial da bradicinina deve-se principalmente à ativação de receptores na superfície de células endoteliais, seguida pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina. A bradicinina promove mudança bifásica do pH intracelular, que pode também modular a liberação de NO pela célula.

Apesar das cininas participarem da regulação de sistemas fisiológicos, são mais conhecidas suas ações na doença: choque, asma, dor e muitas formas de inflamação envolvem a mediação desses peptídios. Cininas podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor,



edema, rubor e calor) e estão próximas do topo da cascata de mediadores envolvidos no processo inflamatório.

Em condições patológicas, a bradicinina é produzida quando a lesão vascular expõe polissacarídeos sulfatados carregados negativamente, ativando o sistema de contato da coagulação. A bradicinina é liberada também quando há oxigenação tecidual inadequada em decorrência de perfusão tecidual deficiente. Na lesão tecidual ou infecção, acúmulo, aderência e ativação de neutrófilos, soma outros mediadores ao local de inflamação, potencializando a ação das cininas. Em muitos tecidos, a bradicinina estimula a fosfolipase A<sub>2</sub>, promovendo a liberação de ácido aracdônico; prostaglandinas e leucotrienos produzidos a partir do ácido aracdônico são especialmente importantes na dor e inflamação. A bradicinina é um mediador da inflamação. A sua atividade vasodilatadora e permeabilizadora facilita a migração dos leucócitos para o tecido afetado.

Não existe nenhum estudo relacionando diretamente o sistema calicreína-cinina com a DECHa ou com o TCTH alogeneico, entretanto, levando em consideração que a DECHa é uma inflamação sistêmica do organismo do indivíduo transplantado, moléculas como a bradicinina que atuam de forma a facilitar o recrutamento dos leucócitos para o sítio de inflamação é de extrema importância no contexto da doença.

Outra via de sinalização que teve destaque e assim contribuiu para ser o processo biológico mais impactado nos pacientes com DECHa foi a via da coagulação sanguínea. A coagulação sanguínea é uma série complexa de interações nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina. O mecanismo bioquímico da formação do coágulo sangüíneo envolve uma seqüência interações proteína-proteína. Consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio em fibrina, por ação de uma enzima denominada trombina (BOZZINI, 2004). É uma série de etapas de ativação, seqüenciais, onde o substrato para cada enzima (ou complexo enzimático) é uma pró-enzima

que é ativada para atuar na próxima etapa da reação, seqüência de reações freqüentemente denominada “cascata” (GUYTON & HALL, 2002; KERR, 2003).

Existem dois mecanismos relacionados intimamente que, quando estimulados, podem gerar fibrina. O mecanismo intrínseco refere-se a seqüência de reações enzimáticas que se inicia quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O mecanismo extrínseco refere-se à seqüência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resultando na liberação de extratos teciduais. (SWENSON, 1996). Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, o que leva, à formação de fibrina (BANKS, 1991).

Sabe-se que existe uma interação entre os mecanismos de inflamação e coagulação. Mecanismos inflamatórios modificam o balanço homeostático favorecendo a ativação da coagulação, assim como a coagulação pode aumentar a resposta inflamatória. Mediadores inflamatórios podem elevar a contagem e a reatividade das plaquetas, regular negativamente mecanismos anticoagulantes naturais, iniciar o sistema de coagulação e facilitar a propagação da resposta à coagulação. Similar a isso, a coagulação pode aumentar a resposta inflamatória pela liberação de mediadores de plaquetas, ativação de células, assim promovendo a interação célula-célula que aumenta a resposta inflamatória (ESMON, 2005).

A ativação dos monócitos e macrófagos na inflamação desencadeia o estímulo para a síntese de mediadores inflamatórios, especialmente as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas agem sinergicamente e são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória e da lesão tecidual, além de induzir a formação e secreção de outros mediadores inflamatórios como: IL-6, IL-8, bradicinina, leucotrienos, óxido nítrico e prostaglandinas. A ação dessas substâncias sobre as células endoteliais é responsável pela alteração do perfil hemostático, isto é, as células endoteliais passam a assumir um papel trombótico e antifibrinolítico. A liberação do fator tissular (via extrínseca da coagulação) constitui o principal mecanismo gerador de trombina na inflamação. A expressão deste aumenta na presença de macrófagos/monócitos e células endoteliais expostas a mediadores

inflamatórios. A geração de trombina por sua vez estimula ainda mais a produção de IL-6 disseminando e potencializando o processo.

A evolução da coagulação sanguínea e da fibrinogênese no pós TCTH alogeneico ainda não foi bem descrita. Pinomaki et al, 2009 analisou vários marcadores de coagulação e atividade fibrinolítica (fragmentos de pró-trombina, tempo de trombina, ativador do plasminogênio tecidual –tPA e inibidor de ativação do plasminogênio – PAI-1) em 30 pacientes submetidos ao TCTH alogeneico. Esses marcadores foram correlacionados com características clínicas dos pacientes como status da doença de base no tempo do transplante, tipo de doador e desenvolvimento de DECH. O aumento da produção de trombina, altos níveis de fibrinogênio e atividade de PAI-1 foi visto no dia D+10 pós TCTH e associado com o desenvolvimento de DECH, sugerindo que ocorre uma relação entre o aumento de fatores de coagulação e imunologia da DECHa. Corroborando assim, com os dados encontrados em nosso trabalho que mostram proteínas importantes da via da coagulação sanguínea aumentadas nos pacientes com DECHa.

A etapa inicial da DECHa envolve dano tecidual e ativação de células APCs dos tecidos do hospedeiro através do regime de condicionamento, o que leva a liberação de LPS e citocinas pró-inflamatórias, o que pode levar a ativação da coagulação sanguínea, como já foi explicado anteriormente. O regime de condicionamento pode ativar plaquetas, e liberar fator tecidual do endotélio que sofreu dano. Esses mecanismos podem talvez, explicar o aumento dos níveis de trombina nos pacientes com DECHa.

Em nosso estudo proteômico, identificamos a proteína NALP12 superexpressa no plasma dos pacientes com DECHa. Os experimentos de validação confirmaram o aumento da expressão dessa proteína no plasma e na pele dos pacientes.

A proteína NALP12 faz parte de um complexo multiproteico denominado inflamossomo. Os inflamossomos pertencem a uma subfamília de receptores PRRs denominada de receptores de ligação a nucleotídeos contendo domínio com seqüência

repetida de resíduos do aminoácido leucina (NLRs) (BAUERNFEIND *et al.*, 2011). Os inflamossomos são complexos citosólicos que estimulam a autocatálise da pró-caspase 1 (CASP1) e sua principal função é promover o processamento de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18 em sua forma ativa (TSCHOPP *et al.*, 2003).

Os inflamossomos reconhecem vários agentes estimuladores da inflamação como os PAMPs (moléculas de padrões moleculares associados a patógenos), DAMPs (moléculas de padrão molecular associadas ao dano) o que leva a direta ativação de caspase-1, subsequentemente a liberação das citocinas pró-inflamatórias já citadas anteriormente. É conhecido que moléculas como adenosina-5'trifosfato (ATP), ácido úrico e componentes solúveis da matriz extracelular, funcionam como DAMPs e são chamados de sinais de perigo endógenos ativadores do inflamossoma (STROWIG, 2012) .

Zeiser *et al.*, 2009 avaliou o efeito do ATP no desenvolvimento de DECHa em camundongos. Foi observado aumento dos níveis de ATP após a irradiação total corporal (regime de condicionamento) e durante o desenvolvimento da DECHa. A estimulação de células apresentadoras de antígenos (APCs) com ATP levou ao aumento da expressão de CD80 e CD86 *in vitro* e *in vivo* atuando uma cascata de eventos pró-inflamatórios incluindo produção de INF- $\gamma$ , ativação e expansão de células T do doador e diminuição de células T regulatórias. Nesse trabalho, também foi avaliado a interação de ATP com seu receptor P2X<sub>7</sub>R. Foi observado que o neutralizando ATP, há um bloqueio em P2X<sub>7</sub>R durante o desenvolvimento de DECHa. O ATP via P2X<sub>7</sub>R tem sido descrito como um sensor de perigo (DAMP) que dirige a maturação e a liberação de IL-1 $\beta$  via inflamossomo (FERRARI *et al.*, 1997).

Recentemente, esse mesmo grupo descreveu a regulação do complexo inflamossomo na DECHa (JANKOVIC, *et al.*). Neste trabalho, eles mostraram que após o regime de condicionamento, o LPS que é liberado pelas bactérias do intestino e o ácido úrico liberado pelo dano celular causado contribuem para ativação do complexo inflamossomo mediado pela

secreção de IL-1 $\beta$ . Em transplantes realizados em camundongos Nlrp3<sup>-/-</sup> foi verificado um atraso no aparecimento de DECHa e diminuição do grau histológico da doença.

Com base nesses trabalhos, nossos resultados que apontam a proteína NALP12 presente no plasma e na pele dos pacientes com DECHa surge como uma nova direção para entender melhor a biologia da doença em humanos e um novo possível biomarcador da doença.

### Conclusões

- A análise proteômica indicou alterações nas vias de sinalização do sistema calicreína-cinina e coagulação sanguínea nos pacientes com DECHa.
- As proteínas cininogênio I e Trombina foram validadas como superexpressas nos pacientes com DECHa no dia D+45 e que tinham LMA como doença de base.
- A proteína NALP12 encontra-se aumentada no plasma e na pele pacientes com DECHa e o complexo inflamossoma encontra-se ativado evidenciado pela expressão da proteína IL1 $\beta$ .

### Referências Bibliográficas

APPELBAUM F.R. The current status of hematopoietic cell transplantation. **Annu Rev Med**, v. 54, n. 3, p. 491-512, Dec 2003.

ARMITAGE J.O. Bone marrow transplantation. **N Engl J Med**, v. 24, n. 12, p. 827-38, Marc 1994.

BARNES D.W.H, CORP M.J, LOUIT J.F, NEAL F.E. Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. **BMJ**, v.2, n. 7, p.626-27, Aug 1956.

BECK S., TROWSDALE J. Sequence organization of the class II region of the human MHC. **Immunol Rev**, v. 5, n. 167 , p. 201-210, Feb 1999.

BILLINGHAM R.E. The biology of graft-versus-host reactions. **Harvey Lect**, n. 62, p., 21-78, Jan 1966.

BOZZINI C. *et al.* Influence of polymorphisms in the factor VII gene promoter on activated factor VII levels and on the risk of myocardial infarction in advanced coronary atherosclerosis. **Thromb Haemost**, v. 93, n.3, p. 541-9, Sep 2004.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.7, n. 72, p. 248-54, May 1976.

CHANG R.J., LEE S.H. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. **J Immuno**.v.9, n. 137, p. 2853-6, Nov 1986.

CHEN Y.B., CUTLER C.S. Biomarkers for acute GVHD: can we predict the unpredictable?. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 6, p. 755-60, Jun 2013.

CHOUDHARY C, MANN M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**., v. 11, n.6, p. 427-39, Jun 2010.

DENNERT G.,ANDERSON CG., WARNER J. T Killer cells play a role in allogeneic bone marrow graft rejection but not in hybrid resistance. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 3729-3734, Dec 1985.

DENTON MD, MAGEE CC, SAYEGH MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. **Lancet**, v. 27, n. 353, p. 1083–91, Mar 1999.

DU ROCHER, B. **Propriedade Imunomodulatória das células estromais de medula óssea: Envolvimento de monócitos e fatores solúveis**, 2012. 130 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Câncer, INCA, Rio de Janeiro, 2012.

FERRARA JL. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. **Curr Opin Immunol**, v.5 n. 5, p. 794-9, Oct 2003.

FERRARA J.L, DEEG H.J. Graft-versus-host disease. **N Engl J Med**, v. 7, n. 324, p. 667-74, Mar 1991.

FERRARA J.L., REDDY P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. **Semin Hematol**, v. 43, n. 1, p. 3-10, Jan 2006.

FERRARA J.L., LEVINE J.E., REDDY P., HOLLER E. **Lancet**, v. 2, n. 373, p. 1550-61, May 2009.

FERRARA JL, *et al.* Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. **Blood**, v. 118 , n. 5, p. 6702-8, Dec 2011.

FILIPOVICH A.H., *et al.* Nacional Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-verus-host disease: I. Diagnosis and staging working group trials in chronic graft-versus-host disease . **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 12, p. 945-56, Jun 2005.

FUJII N., *et al.* Serum cytokine concentrations and acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Concurrent measurement of ten cytokines and their respective ratios using cytometric bead array. **Inter J Mol Medicine** , v. 17, p. 881-88, Jan 2006.

GOO Y.A., GOODLETT D.R. Advances in proteomic cancer biomarker discovery. [\*\*J Proteomics.\*\*](#), v.10, n. 73, p. 1839-50, Sep 2010.

GOKER H., HAZNEDAROGLU I.C., CHAO N.J. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. **Exp Hematol**, v. 29 n. 3 , p. 259-77, Marc 2001.



GOULMY E., *et al.* Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **N. Engl. J. Med**, v. 334, n. 5, p. 281-85, Feb 1996.

GRAUBERT T.A., DIPERSIO J.F., RUSSEL JH. Perforin/granzyme dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. **J Clin Invest.**, v. 15, n.4 p. 904– 11, Aug 1997.

HAUSERMANN P., *et al.* Cutaneous graft-versus-host disease: a guide for the dermatologist. **Dermatology**, v. 216, n. 4, p. 287-304, Jan 2008.

HANSEN J.A. *et al.* Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. **Immunol Rev**, v. 157, n. 45, p. 157:141-51, Jun 2007.

HANNUM C.H., *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. **Nature**, v. 29, n.3, p. 336-40, Mar 1990; 343:336–40.

HO I.C., GLIMCHER L.H. Transcription: tantalizing times for T cells. **Cell**. 109 S109–20, Apr 2002.

HORI T, *et al.* CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. **Blood**, v. 15, n. 8, p. 4403-12, Jul 2008.

JACOBSONHN D.A., VOGELSANG G.B. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, p. 2-35, Abr 2007.

JAKSCH M., REMBERGER M., MATTSSON J. Increased Gene Expression of Chemokine Receptors Is Correlated with Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 4, p. 280-287, Apr. 2005

JANKOVIC D. *et al.* The Nlrp3 inflammasome regulates acute graf-versus-host disease. **J Exp Med**, v. 23, n. 210, p. 1899-910, Sep. 2013

KAISER T., *et al.* Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 340-9, Jun 2004.

KAVAKLI K., *et al.* Safety profiles of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> oral preparations in the treatment of iron deficiency anemia in children. **Pediatr Hematol Oncol.**, v. 21, n.5, p. 403-10, Aug 2004.

LIOTTA L.A., PETRICOIN E.F. 3rd. **Clin Adv Hematol Oncol.**, v. 1, n. 8, p. 460-2, Aug 2003.

MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**; v. 12, n. 296, p. 301-5, Apr 2002.

MARTIN P.J., *et al.* A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. **Blood**, v. 76, n. 8, p. 1464-1472, Oct 1990.

MARTIN L.J., FARMER F. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. 369-92, Jan 1998.

MARTIN P., *et al.* Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-versus-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched-sibling or unrelated donors. **Bone Marrow Transplant.**, v. 32, n.9, p. 881-7, Nov 2003.

MCGUIRK M., *et al.* Serum proteomic profiling and haptoglobin polymorphisms in patients with GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **J Hematol Oncol.**, v. 20, n. 7, p. 2-17, Apr 2009.

NILSSON T., *et al.* Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. **Nat Methods.**, v.7, n. 9, p. 681-5, Sep 2010.

PACZESNY S., *et al.* A biomarker panel for acute graft versus-host disease. **Blood**, v. 113, n. 2, p. 273-8, Jan 2009.

PACZESNY S., *et al.* Plasma biomarkers in graft versus-host disease: a new era? **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 15, n.1, p. 33-8, Jan 2009.

PACZESNY S., *et al.* Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 3, p. 2-13, Jan 2010.

PINTO, D.O. **ACOMPANHAMENTO PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS: À PROCURA DE BIOMARCADORES DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA.** 2010. 179 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional do Câncer, INCA, Rio de Janeiro, 2010.

PIPER K.P., *et al.* CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 110, n.12, p. 3827-32, Dec 2007.

POBER J.S., *et al.* Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? **Transplantation**, v. 15, n. 61, p. 343-9, Feb 1996.

REMBERGER M., *et al.* Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Haematol**, v. 70, n.6, p. 384-391, Jun 2003.

RUAL J.F., *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. **Nature**, v. 20, n. 437, p. 1173-8, Oct 2005.

SALAMA A.D., *et al.* Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. **J Clin Invest**, v. 108, n.7, p. 943-8, Oct 2001.

SHIINA, T.G., TAKISHIIMA N., INOKO H. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb human MHC class I region. **Immunol Rev.**, v.167, p. 193-199, Feb 1999.

SHILOMCHIK W.D. Graft-versus-host disease **Nature Reviews Immunol.**, v.7, n. 5, p. 340-352, May 2007.

SRINIVASAN R., *et al.* Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis. **Exp Hemato**, v. 34, n.6, p. 796-801, Aug 2006.

STELZL U., *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 957-68, Jul 2005.

STOREK J., *et al.* Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. **Semin Immunopathol**, v. 30, n.4, p. 425-37, Dec 2008.

TSCHOPP J., MARTINON F., BURNS K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.4,n.2, p. 95-104, Feb 2003.

TSENG S.Y., DUSTIN M.L. T-cell activation: a multidimensional signaling network. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 14, n. 5, p. 575-80, Oct 2002; 14:575–80.

VOLGELSANG G.B., LEE L., BENSEN D.M. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. **Annu Rev Med**, v. 3. n. 54, p. 29-52, Dec 2003.

WALL D.A., SHEEHAN K.C. The role of tumor necrosis factor and interferon gamma in graft-versus-host disease and related immunodeficiency. **Transplantation**, v. 57, n. 2, p. 273-9, Jan 1994.

WATANABE F.R., *et al.* The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. **J Immunol.**1992; 148:1274–9.

WELNIAK L.A. BLAZAR B.R. MURPHY W.J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Annu Rev Immunol** 2007; 25:139-70.

WEISSINGER E.M., *et al.* Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood** 2007; 109:12.

XUN C.Q., *et al.* Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. **Blood** 1994; 83:2360–7.

ZHOU Y., BARNETT M.J., RIVERS J.K. Clinical significance of skin biopsies in the diagnosis and management of graft-versus-host disease in early postallogeneic bone marrow transplantation. **Arch Dermatol** 2000; 136:717-721.

# ANEXOS



Anexo I: Tabela de proteínas expressas no plasma de pacientes com DECHa

<b>Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas no plasma de pacientes com DECHa</b>			
<b>Proteínas exclusivas ou superexpressas no plasma de pacientes com DECHa que tiveram LMA como doença de base</b>			
<b>Nome do Gene</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Razão não DECHa: com DECHa</b>
ANT3_HUMAN	Antithrombin III OS Homo sapiens GN SERPINC1 PE 1 SV 1	489.32	Somente na DECHa
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B 100 OS Homo sapiens GN APOB PE 1 SV 1	51.88	Somente na DECHa
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C III OS Homo sapiens GN APOC3 PE 1 SV 1	1333.28	Somente na DECHa
APOH_HUMAN	Beta 2 glycoprotein 1 OS Homo sapiens GN APOH PE 1 SV 3	799.82	Somente na DECHa
CO4B_HUMAN	Complement C4 B OS Homo sapiens GN C4B PE 1 SV 1	685.88	Somente na DECHa
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS Homo sapiens GN HBB PE 1 SV 2	1664.41	Somente na DECHa
HV318_HUMAN	Ig heavy chain V III region TUR OS Homo sapiens PE 1 SV 1	283.88	Somente na DECHa
HV303_HUMAN	Ig heavy chain V III region VH26 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1270.41	Somente na DECHa
KV204_HUMAN	Ig kappa chain V II region TEW OS Homo sapiens PE 1 SV 1	215.15	Somente na DECHa
KV302_HUMAN	Ig kappa chain V III region SIE OS Homo sapiens PE 1 SV 1	451.48	Somente na DECHa
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	298.74	Somente na DECHa
NAL12_HUMAN	NACHT LRR and PYD domains containing protein 12 OS Homo sapiens GNNLRP12PE2SV 2	79.63	Somente na DECHa
AMBP_HUMAN	Protein AMBP OS Homo sapiens GN AMBP PE 1 SV 1	464.59	Somente na DECHa
CA175_HUMAN	Uncharacterized protein C1orf175 OS Homo sapiens GN C1orf175 PE 2 SV 3	48.83	Somente na DECHa
ZA2G_HUMAN	Zinc alpha 2 glycoprotein OS Homo sapiens GN AZGP1 PE 1 SV 1	248.44	Somente na DECHa
APT_HUMAN	Adenine phosphoribosyltransferase OS Homo sapiens GN APRT PE 1 SV 2	323.47	Somente na DECHa
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen OS Homo sapiens GN AGT PE 1 SV 1	956.33	Somente na DECHa
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A IV OS Homo sapiens GN APOA4 PE 1 SV 3	357.21	Somente na DECHa
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C II OS Homo sapiens GN APOC2 PE 1 SV 1	833.01	Somente na DECHa
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS Homo sapiens GN C1R PE 1 SV 2	265.71	Somente na DECHa
CO5_HUMAN	Complement C5 OS Homo sapiens GN C5 PE 1 SV 4	251.02	Somente na DECHa
CO9_HUMAN	Complement component C9 OS Homo sapiens GN C9 PE 1 SV 2	531.2	Somente na DECHa

FHR1_HUMAN	Complement factor H related protein 1 OS Homo sapiens GN CFHR1 PE 1 SV 2	233.8	Somente na DECHa
EP400_HUMAN	E1A binding protein p400 OS Homo sapiens GN EP400 PE 1 SV 3	224.88	Somente na DECHa
EF1A2_HUMAN	Elongation factor 1 alpha 2 OS Homo sapiens GN EEF1A2 PE 1 SV 1	734.98	Somente na DECHa
FINC_HUMAN	Fibronectin OS Homo sapiens GN FN1 PE 1 SV 3	548.55	Somente na DECHa
FAHD1_HUMAN	Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN FAHD1 PE 1 SV 2	770.56	Somente na DECHa
GELS_HUMAN	Gelsolin OS Homo sapiens GN GSN PE 1 SV 1	255.1	Somente na DECHa
RAN_HUMAN	GTP binding nuclear protein Ran OS Homo sapiens GN RAN PE 1 SV 3	3319.29	Somente na DECHa
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS Homo sapiens GN HBA1 PE 1 SV 2	2763.16	Somente na DECHa
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2 OS Homo sapiens GN SERPIND1 PE 1 SV 3	567.22	Somente na DECHa
HV306_HUMAN	Ig heavy chain V III region BUT OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1127.66	Somente na DECHa
HV319_HUMAN	Ig heavy chain V III region JON OS Homo sapiens PE 1 SV 1	565.39	Somente na DECHa
KV107_HUMAN	Ig kappa chain V I region Gal OS Homo sapiens PE 1 SV 1	634.08	Somente na DECHa
KV108_HUMAN	Ig kappa chain V I region Hau OS Homo sapiens PE 1 SV 1	623.5	Somente na DECHa
KV116_HUMAN	Ig kappa chain V I region Roy OS Homo sapiens PE 1 SV 1	601.85	Somente na DECHa
KV201_HUMAN	Ig kappa chain V II region Cum OS Homo sapiens PE 1 SV 1	307.07	Somente na DECHa
ITIH1_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H1 OS Homo sapiens GN ITIH1 PE 1 SV 3	510.51	Somente na DECHa
ITIH4_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H4 OS Homo sapiens GN ITIH4 PE 1 SV 4	279.32	Somente na DECHa
KNG1_HUMAN	Kininogen 1 OS Homo sapiens GN KNG1 PE 1 SV 2	1321.56	Somente na DECHa
A2GL_HUMAN	Leucine rich alpha 2 glycoprotein OS Homo sapiens GN LRG1 PE 1 SV 2	346.89	Somente na DECHa
MFAP1_HUMAN	Microfibrillar associated protein 1 OS Homo sapiens GN MFAP1 PE 1 SV 2	231.18	Somente na DECHa
NFKB2_HUMAN	Nuclear factor NF kappa B p100 subunit OS Homo sapiens GN NFKB2 PE 1 SV 4	222.13	Somente na DECHa
PLGA_HUMAN	Plasminogen related protein A OS Homo sapiens GN PLGLA PE 3 SV 1	321.86	Somente na DECHa
THRB_HUMAN	Prothrombin OS Homo sapiens GN F2 PE 1 SV 2	621.07	Somente na DECHa
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase arylesterase 1 OS Homo sapiens GN PON1 PE 1 SV 2	202.6	Somente na DECHa
THAS_HUMAN	Thromboxane A synthase OS Homo sapiens GN TBXAS1 PE 1 SV 3	158.5	Somente na DECHa
TTHY_HUMAN	Transthyretin OS Homo sapiens GN TTR PE 1 SV 1	1720.27	Somente na DECHa
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain OS Homo sapiens GN FGG PE 1 SV 3	16625.2	0.89
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	10246.5	0.85



HPT_HUMAN	Haptoglobin OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	25564.3	0.84
TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 2	17907.9	0.84
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS Homo sapiens GN IGKC PE 1 SV 1	60149.6	0.81
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	1707.72	0.79
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	2266.91	0.7
PLMN_HUMAN	Plasminogen OS Homo sapiens GN PLG PE 1 SV 2	492.51	0.69
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	12761.9	0.64
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain OS Homo sapiens GN FGA PE 1 SV 2	12110.6	0.64
IGHA1_HUMAN	Ig alpha 1 chain C region OS Homo sapiens GN IGH A1 PE 1 SV 2	3580.67	0.64
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	363.65	0.64
A1AG2_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 2 OS Homo sapiens GN ORM2 PE 1 SV 2	363.94	0.63
A1BG_HUMAN	Alpha 1B glycoprotein OS Homo sapiens GN A1BG PE 1 SV 3	4178.53	0.6
AACT_HUMAN	Alpha 1 antichymotrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA3 PE 1 SV 2	6822.35	0.58
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor OS Homo sapiens GN SERPING1 PE 1 SV 2	5230.73	0.55
HBE_HUMAN	Hemoglobin subunit epsilon OS Homo sapiens GN HBE1 PE 1 SV 2	4296.71	0.41

**Proteínas exclusivas ou com a expressão diminuída no plasma dos pacientes com DECHa que tiveram LMA como doença de base**

Nome do Gene	Descrição	Score	Razão sem DECHa: com DECHa
KV307_HUMAN	Ig kappa chain V III region GOL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	451.48	Somente no sem DECHa
MYLK2_HUMAN	Myosin light chain kinase 2 skeletal cardiac muscle OS Homo sapiens GN MYLK2 PE 1 SV 3	42.14	Somente no sem DECHa
TRY6_HUMAN	Putative trypsin 6 OS Homo sapiens GN TRY6 PE 5 SV 1	346.09	Somente no sem DECHa
SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein OS Homo sapiens GN SAA1 PE 1 SV 2	194.78	Somente no sem DECHa
SMTN_HUMAN	<u>Smoothelin</u> OS Homo sapiens GN SMTN PE 1 SV 5	98.01	Somente no sem DECHa
VP13D_HUMAN	Vacuolar protein sorting associated protein 13D OS Homo sapiens GN VPS13D PE 1 SV 1	34.47	Somente no sem DECHa
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta OS Homo sapiens GN HBD PE 1 SV 2	4892.56	Somente no sem DECHa
HV320_HUMAN	Ig heavy chain V III region GAL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1825.23	Somente no sem DECHa
HV318_HUMAN	Ig heavy chain V III region TUR OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1772.4	Somente no sem DECHa

HV303_HUMAN	Ig heavy chain V III region VH26 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	5683.44	Somente no sem DECha
TMCC1_HUMAN	Transmembrane and coiled coil domains protein 1 OS Homo sapiens GN TMCC1 PE 1 SV 2	191.46	Somente no sem DECha
HV304_HUMAN	Ig heavy chain V III region TIL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1964.14	9.68
IGHG4_HUMAN	Ig gamma 4 chain C region OS Homo sapiens GN IGHG4 PE 1 SV 1	8565.29	4.1
IGHG2_HUMAN	Ig gamma 2 chain C region OS Homo sapiens GN IGHG2 PE 1 SV 2	12269.1	2.75
IGHG3_HUMAN	Ig gamma 3 chain C region OS Homo sapiens GN IGHG3 PE 1 SV 2	7002.47	2.46
CO4A_HUMAN	Complement C4 A OS Homo sapiens GN C4A PE 1 SV 1	3066.82	2.12
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein OS Homo sapiens GN PZP PE 1 SV 4	337.94	1.86
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A II OS Homo sapiens GN APOA2 PE 1 SV 1	3566.52	1.57
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	8465.91	1.54
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS Homo sapiens GN IGKC PE 1 SV 1	51321.5	1.52
IGHG1_HUMAN	Ig gamma 1 chain C region OS Homo sapiens GN IGHG1 PE 1 SV 1	35845.9	1.39
A1AG1_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 1 OS Homo sapiens GN ORM1 PE 1 SV 1	1780.19	1.35
LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions OS Homo sapiens GN IGLC1 PE 1 SV 1	23828	1.2
ALBU_HUMAN	Serum albumin OS Homo sapiens GN ALB PE 1 SV 2	51986.3	1.15
A2MG_HUMAN	Alpha 2 macroglobulin OS Homo sapiens GN A2M PE 1 SV 2	9246.26	1.09



**Tabela II. Dados clínicos resumidos dos pacientes**

<i>Pacientes</i>	<i>Com DECHa (n=20)</i>	<i>Sem DECHa (n=11)</i>
Idade-média (faixa etária)	39,25 (12-58)	29,8 (06-48)
Sexo (homem:mulher)	15:05	05:06
<b>Tipo de transplante</b>		
Aparentado n (%)	19(95)	8 (72,3)
Não Aparentado n(%)	1(5)	3 (27,7)
<b>Fonte de células tronco</b>		
Medula Óssea n(%)	12 (60)	06 (54,5)
Sangue Periférico n(%)	8 (40)	3 (27,3)
SCUP n(%)	0	2(18,2)
<b>Regime de Condicionamento</b>		
Bu+Cy n(%)	19 (95)	7(63,3)
Bu+Cy+TBI n(%)	1(5)	3 (27,3)
Mel +TBI n(%)	0	1 (9,2)
<b>Profilaxia da DECHa</b>		
CSA + MTX n(%)	18(90)	11(100)
CSA n(%)	2(10)	0
<b>Status da doença de base</b>		
Remissão n(%)	20(100)	11(100)
Recaída n(%)	0	0
<b>Estadiamento da DECHa</b>		
Grau II n(%)	12 (60)	0
Grau III n(%)	7(35)	0
Grau IV	1(5)	0

**Legenda:** SCUP- sangue de cordão umbilical e placentário; Bu- bussulfano; Cy- ciclofosfamida; TBI- irradiação total corpórea; CSA-ciclosporina; MTX-metrotexato.

## Anexo II: Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-INCA)



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Instituto Nacional de Câncer  
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

À: Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay  
Pesquisadora Principal

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2006

**Registro CEP nº 033/06** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)  
**Título do Projeto:** Moléculas envolvidas no endereçamento de células tronco humanas

Prezada Doutora

Informamos abaixo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

Adriana Alves de Souza Scheliga  
Adriana Bonomo  
André Marcelo Machado Soares  
Carlos Frederico de Freitas Lima  
Carlos Henrique D da Silva  
Ilana Zalberg Renault  
Ilce Ferreira da Silva  
Ivan da Costa Marques  
José Bines  
José Cláudio Casali  
Leticia Segadas  
Liz Maria de Almeida  
Maria Celeste de O. P. F. Esteves  
Mauro Zamboni  
Miguel Ângelo Martins Moreira  
Paulo Alexandre Mora  
Paulo Antonio Silveira de Faria  
Walter Esteves Piñeiro

Médica Oncologista Clínica HC I  
Médica Medicina Experimental  
Teólogo / Filósofo Extra INCA  
Médico Cirurgião Mastologista H CIII  
Médico HC IV  
Hematologista HC I INCA  
Enfermeira HC II INCA  
Matemático Extra INCA  
Médico Oncologista HC III  
Médico Coordenador do Banco de Tumores do INCA  
Representante de usuários Extra INCA  
Saúde Coletiva INCA  
Representante de Usuários Extra INCA  
Médico Pneumologista HC I  
Biólogo Divisão de Genética  
Médico Oncologista HCII  
Médico Patologista DIPAT INCA  
Advogado Extra INCA

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

## **Anexo III: Termo de consentimento Livre e esclarecido para coleta de sangue periférico dos pacientes**

### **Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecimento aos Pacientes**

É necessário que o (a) senhor (a) leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, caso o (a) senhor (a) não entenda qualquer palavra ou informação, por favor peça explicações detalhadas para o profissional do serviço.

**Nome do estudo:** “AVALIAÇÃO DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA ATRAVÉS DE EXAMES ESPECÍFICOS DE SANGUE.”

#### **Objetivo do estudo:**

A doença enxerto contra hospedeiro aguda é uma das complicações mais importantes que ocorre após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea). Pode se manifestar na pele com o aparecimento de manchas vermelhas na face, tronco e membros, assim como em outros órgãos como o fígado, a boca, o estômago, o intestino e os pulmões. Se utilizam medicações na prevenção desta complicação. O tratamento em geral é feito com medicações que diminuem a imunidade do paciente, aumentando o risco de infecções. O objetivo principal deste estudo é verificar a variação das populações celulares sanguíneas em dias pré-selecionados, além de analisar a variação de substâncias secretadas por essas populações. Para tal, é necessário que se retire amostras de sangue do paciente antes e após o transplante nos dias D-8 e D0 (pré-transplante), e nos dias D+14, D+28, D+45, D+100, D+180 e D+360 (pós-transplante).

#### **Riscos:**

O presente estudo não oferece nenhum risco para o paciente, pois esse procedimento faz parte da rotina do serviço do CEMO.

#### **Confidencialidade:**

Todos os dados provenientes deste estudo e relativos aos pacientes serão processados de forma anônima, sem o nome ou endereço dos participantes. A proteção dos dados será inteiramente garantida mesmo em caso de publicação em revistas científicas.

**Participação Voluntária:**

O seu consentimento para a participação no estudo é livre e voluntário e não haverá nenhuma forma de pagamento. Também não existirão custos por parte do paciente para que seja realizado o estudo. Por ser uma participação voluntária, o (a) senhor (a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não dê a sua autorização.

**Em caso de dúvidas:**

Em caso de dúvidas, entrar em contato com a Dra. Adriana Scheliga do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, no telefone 3233-1353, ou com o pesquisador responsável por esse estudo, o Dr. Luis Fernando da Silva Bouzas, no CEMO/INCA, no telefone 2506-6215.

**“AVALIAÇÃO DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA  
ATRAVÉS DE EXAMES ESPECÍFICOS DE SANGUE.”**

**TERMO DE CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO**

Concordo em doar uma pequena quantidade do meu sangue para pesquisa, desde que seja sempre respeitada a confiabilidade dos dados contidos na ficha, bem como a minha identidade. Entendo que não receberei nenhuma compensação financeira, ou qualquer tipo de doação, pela participação no estudo. Confirmando ter lido e entendido completamente todas as informações, a natureza do estudo e voluntariamente concordo em participar do mesmo.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do profissional responsável pela coleta: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



## Anexo IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta de biópsias de pele

### Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido ao Paciente

É necessário que o (a) senhor (a) leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, caso o(a) senhor(a) não entenda qualquer palavra ou informação, por favor peça explicações detalhadas para o profissional do serviço.

**Nome do estudo:** "AVALIAÇÃO PRECOCE DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO ATRAVÉS DE EXAME HISTOPATOLÓGICO DA PELE E IMUNOHISTOQUÍMICA SERIADAS."

#### **Objetivo do estudo:**

A doença enxerto contra hospedeiro é uma das complicações mais importantes que ocorre após o transplante de células tronco hematopoéticas (medula óssea). Pode se manifestar na pele com o aparecimento de manchas vermelhas em face, tronco e membros, assim como em outros órgãos como o fígado, a boca, o estômago, o intestino e os pulmões. Se utilizam medicações na prevenção desta complicação. O tratamento em geral é feito com medicações que diminuem a imunidade do paciente, aumentando o risco de infecções.

O objetivo principal deste estudo é verificar através de exames especializados (histopatologia e imunohistoquímica) a forma como aparece a doença. Para tal são necessárias biópsias seriadas de pele, além de coletas simultâneas de sangue, para identificar precocemente, antes mesmo que a doença enxerto contra hospedeiro se manifeste clinicamente. Para isso faremos a retirada de pequenas amostras de pele no tamanho de 2,5 mm, que serão coletadas no dias -8 (antes do transplante), 0 (dia do transplante) e nos dias +14, +28 e +100 (após o transplante).

#### **Riscos:**

O presente estudo não oferece nenhum risco para o paciente, pois esse procedimento faz parte da rotina do serviço do CEMO.

**“AVALIAÇÃO PRECOCE DA DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO ATRAVÉS DE EXAME HISTOPATOLÓGICO DA PELE E IMUNOHISTOQUÍMICA SERIADAS.”**

**TERMO DE CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO:**

Concordo em ser submetido as biópsias de pele necessárias, desde que seja respeitado sempre a confidencialidade dos dados contidos na ficha, bem como a minha identidade.

Entendo que não receberei nenhuma compensação financeira, ou qualquer tipo de doação, pela participação no estudo.

Confirmo ter lido e entendido completamente todas as informações, a natureza do estudo e voluntariamente concordo em participar do mesmo.

Nome do(a) paciente: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Assinatura do(a) doador(a): \_\_\_\_\_ data: / /

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /

Nome do(a) profissional responsável pela biópsia: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /

Nome do(a) pesquisador(a) responsável: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ data: / /





