

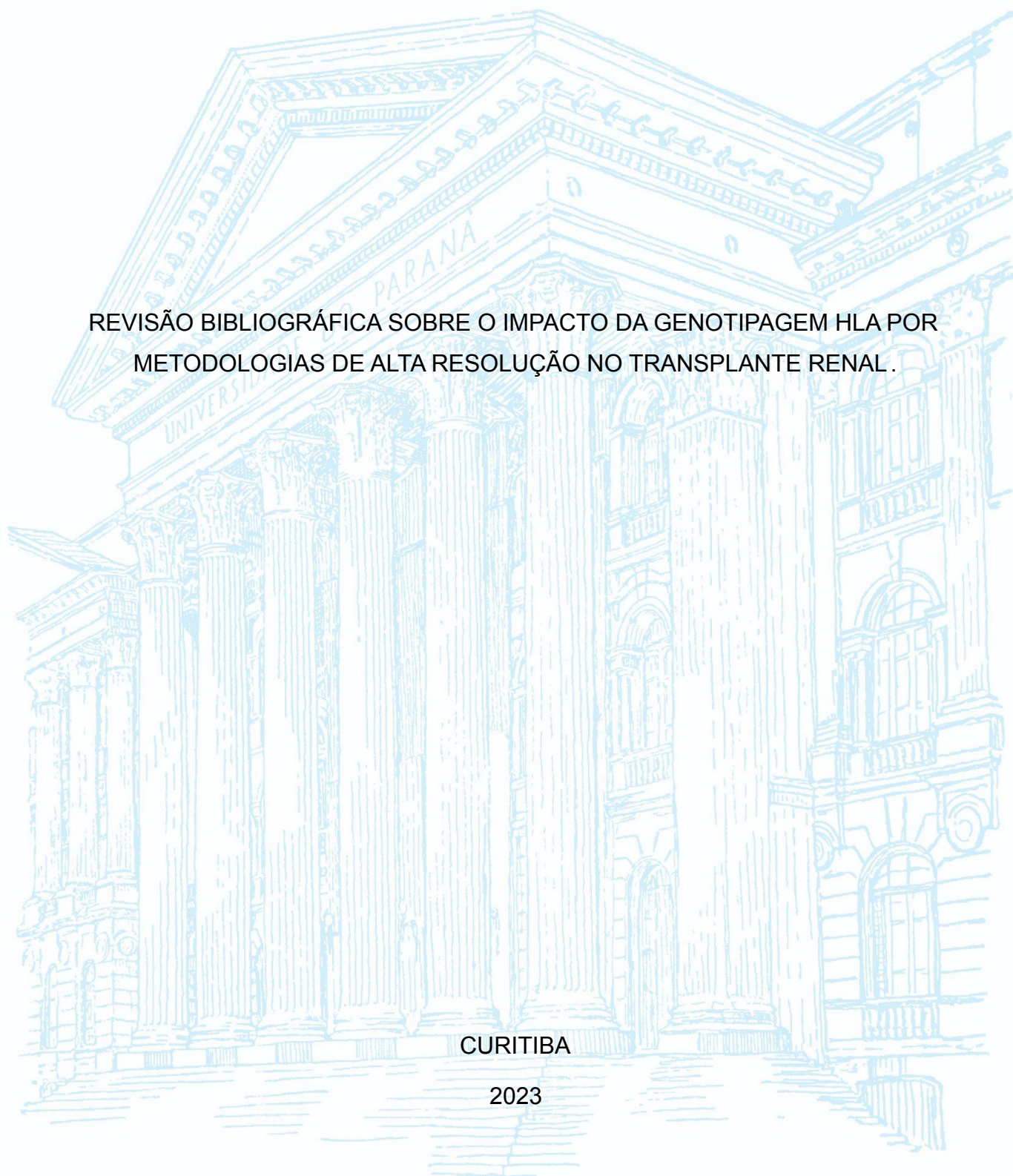
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARIANE MONTEIRO SIMM

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O IMPACTO DA GENOTIPAGEM HLA POR
METODOLOGIAS DE ALTA RESOLUÇÃO NO TRANSPLANTE RENAL.

CURITIBA

2023



ARIANE MONTEIRO SIMM

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O IMPACTO DA GENOTIPAGEM HLA POR
METODOLOGIAS DE ALTA RESOLUÇÃO NO TRANSPLANTE RENAL .

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas, pelo curso de
Ciências Biológicas, do Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Patricia Savio de Araujo Souza

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por cuidar da minha vida e me auxiliar com força e coragem, proporcionando chegar até este momento.

A minha orientadora Prof. Patricia Savio de Araujo Souza por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa e auxiliar durante este período todo o encaminhamento que permitiu a realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Maria da Graça Bicalho e Daniela Fiori Gradia pela leitura do texto e pelas contribuições para a versão final deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de estudar em um dos melhores ensinos públicos e de qualidade do país, sou muito grata a toda experiência nos dada durante esses cinco anos.

Aos meus pais Rosiane Monteiro, Arison Simm, que durante todo o curso estiveram presentes e foram meu sustento, incentivo e apoio para que eu pudesse persistir até aqui.

Aos meus irmãos Aline Monteiro, Ryan Monteiro, por me distrair e deixar esse momento mais leve.

Ao meu noivo Leandro que esteve ao meu lado durante esse período, ouvindo todas as minhas ideias e lamentações, me dando suporte e encorajamento.

Aos meus amigos e colegas, pelos momentos de descontração e pelo apoio neste trabalho. São amizades que levo para a vida, com muito carinho.

A todos que, de alguma maneira, passaram pelo meu caminho e deixaram sua contribuição para que pudéssemos chegar ao final do curso.

RESUMO

Dentre as categorias de transplante de órgãos sólidos, o transplante renal é o procedimento mais realizado no Brasil. Ao mesmo tempo possui a maior fila de espera tanto para adultos quanto para crianças. Um dos fatores que contribui na demora em encontrar um doador, é a necessidade da compatibilidade do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), responsável por gerar uma resposta imunológica, proporcionando ao paciente sucesso ou rejeição do enxerto. De acordo com a legislação brasileira atualmente vigente no país, para o transplante renal, são exigidas somente metodologias de baixa e média resolução na genotipagem HLA. Logo o presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica de trabalhos que abordam utilização de metodologias de alta resolução no processo de tipagem, relatando os impactos e limitações destas metodologias no transplante renal. Dentre as opções de alta resolução, destacam-se o sequenciamento de Sanger e o sequenciamento de nova geração, do inglês, *New Generation Sequencing* (NGS), ambos fundamentados no sequenciamento das bases de DNA fornecendo o resultado da genotipagem em nível alélico. Estão em andamento estudos utilizando metodologias de terceira geração, realizando sequenciamento a partir da leitura única do DNA. Como resultado, a utilização da metodologia de alta resolução contribui com uma maior precisão na tipagem do paciente e doador, trazendo benefícios como a sobrevida do enxerto e auxílio no acompanhamento pós transplante. Outras contribuições da utilização da tipagem em alta resolução, é o auxílio na utilização adequada de imunossupressores relacionando os alelos do paciente com a farmacogenética do imunossupressor. Com melhorias das plataformas de sequenciamento e redução dos custos, espera-se que estudos envolvendo a genotipagem HLA de alta resolução, possam ser desenvolvidas no Brasil, e que as futuras revisões da legislação sobre transplante possam englobar a genotipagem em alta resolução no diagnóstico HLA nos processos de transplante renal.

Palavras-chave: Transplante renal; Genotipagem HLA; Metodologias de alta resolução.

ABSTRACT

Among the categories of solid organ transplantation, kidney transplantation is the most performed procedure in Brazil. At the same time, it has the longest waiting list for both adults and children. One of the factors that contributes to the delay in finding a donor is the need for compatibility of the human leukocyte antigen system (HLA), responsible for generating an immune response, providing the patient with success or rejection of the graft. According to the Brazilian legislation currently in force in the country, for kidney transplantation, only low and medium resolution methodologies are required in HLA genotyping. Therefore, the present work aims to carry out a bibliographic review of works that address the use of high-resolution methodologies in the typing process, reporting the impacts and limitations of these methodologies in kidney transplantation. Among the high-resolution options, Sanger and new generation sequencing (NGS) stand out, which consists of sequencing DNA bases providing the result of genotyping at the allelic level. Studies are underway using third-generation methodologies, performing sequencing from a single DNA reading. As a result, the use of high-resolution methodology contributes to greater accuracy in patient and donor typing, bringing benefits such as graft survival and assistance in post-transplant follow-up. Other contributions of the use of high-resolution typing is the aid in the proper use of immunosuppressants by relating the patient's alleles with the pharmacogenetics of the immunosuppressant. With improvements in sequencing platforms and cost reduction, it is expected that studies involving high-resolution HLA genotyping can be developed in Brazil, and that future revisions of legislation on transplantation can include high-resolution genotyping in HLA diagnosis in the kidney transplant processes.

Key-words: Kidney transplantation; HLA genotyping; High resolution methodologies.

SUMÁRIO

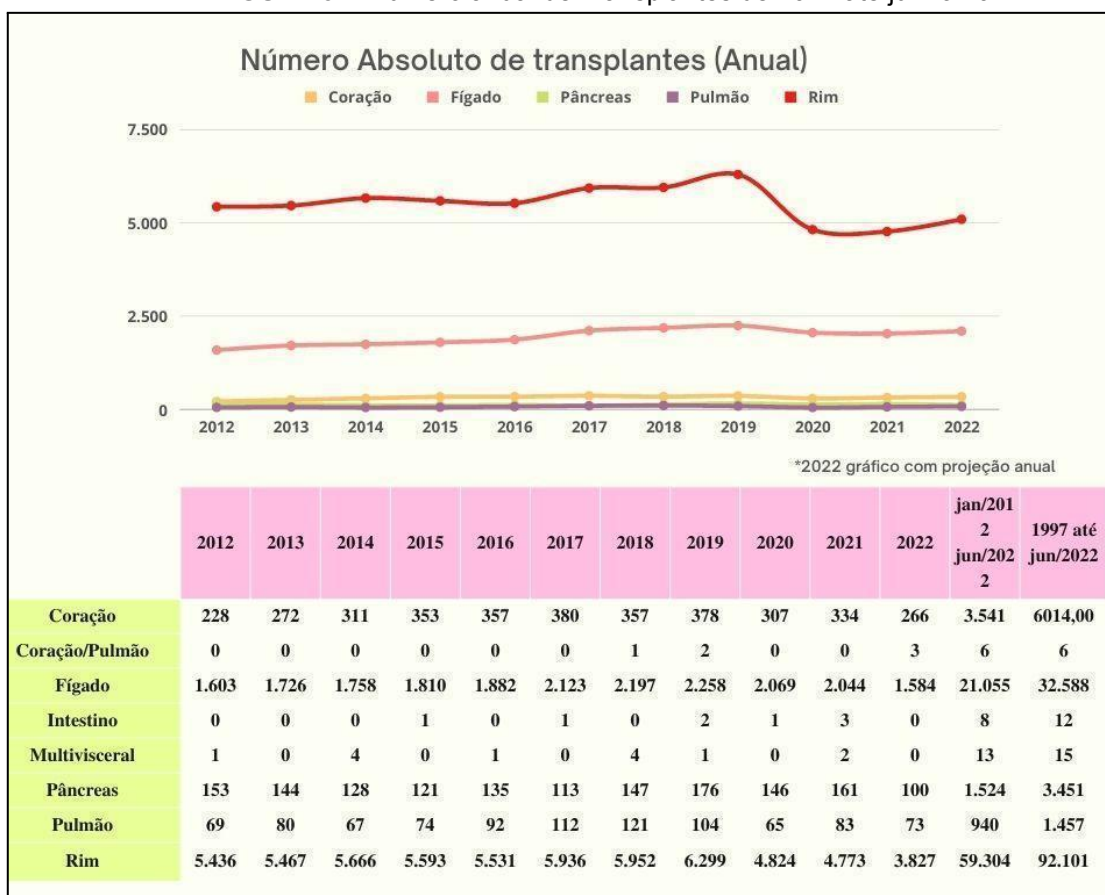
1. INTRODUÇÃO	6
2. PROBLEMA	10
3. OBJETIVOS	10
4. JUSTIFICATIVA	10
5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
5.1 ESTRUTURA DO SISTEMA HLA: GENES E PROTEÍNAS	11
5.2 HERANÇA	13
5.3 NOMENCLATURA HLA	15
5.4 RESPOSTA IMUNE NO TRANSPLANTE	17
5.5 TIPAGEM HLA	18
5.5.1 Método Sorológico	18
5.5.2 Diferenças nas metodologias de tipagem.	19
5.5.3 Método de tipagem por PCR-SSP	20
5.5.4 Método de tipagem por PCR-SSO	20
5.5.5 Método de tipagem por SBT	21
5.5.6 Método de tipagem por NGS	22
5.5.7 Método de tipagem por sequenciamento de terceira geração	25
6. METODOLOGIA	27
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior programa de transplante de órgãos do mundo, sendo oferecido de maneira pública através do Sistema Único de Saúde (SUS). O órgão responsável em administrar os processos do transplante como, a elaboração das regulamentações, monitoramento de fila de espera, captação, logística e distribuição é o Sistema Nacional de Transplante (SNT), (BRASIL,2022).

O rim é o órgão mais transplantado no Brasil, segundo o registro brasileiro de transplante (RBT). Entre 1997 e junho de 2022 foram realizados no território brasileiro aproximadamente 92.101 transplantes renais como representado na FIGURA 01. Em 2020 em decorrência da pandemia de Covid-19 houve um declínio no número de transplantes, contudo o transplante renal permaneceu em primeiro lugar como o órgão mais transplantado, dentre os órgãos sólidos (ABTO,2022).

FIGURA 01- Número anual de Transplantes de 2012 até junho/2022



FONTE: Adaptado de Registro Brasileiro de Transplantes (2022)

Ao mesmo tempo que o transplante renal é o procedimento mais realizado no Brasil nas especialidades de transplante (TABELA 01), sua fila de espera é a mais numerosa dentre os órgãos sólidos. A quantidade de pacientes distribuídos pelo Brasil que aguardam por um rim chegou em setembro de 2022 a 336 pacientes pediátricos e 28.114 pacientes adultos de acordo com os dados da Associação Brasileira de Transplante de órgãos (ABTO), (ABTO,2022).

TABELA 01 -Número de pacientes na fila de espera de um órgão

PACIENTES PEDIÁTRICOS ATIVOS EM LISTA DE ESPERA - (SETEMBRO 2022)							
	RIM	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	PÂNCREAS	PÂNC/RIM	TOTAL
Brasil	336	70	47	8	0	0	461
PACIENTES ADULTOS ATIVOS EM LISTA DE ESPERA - (SETEMBRO 2022)							
	RIM	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	PÂNCREAS	PÂNC/RIM	TOTAL
Brasil	28.114	1.257	330	175	99	312	30.287

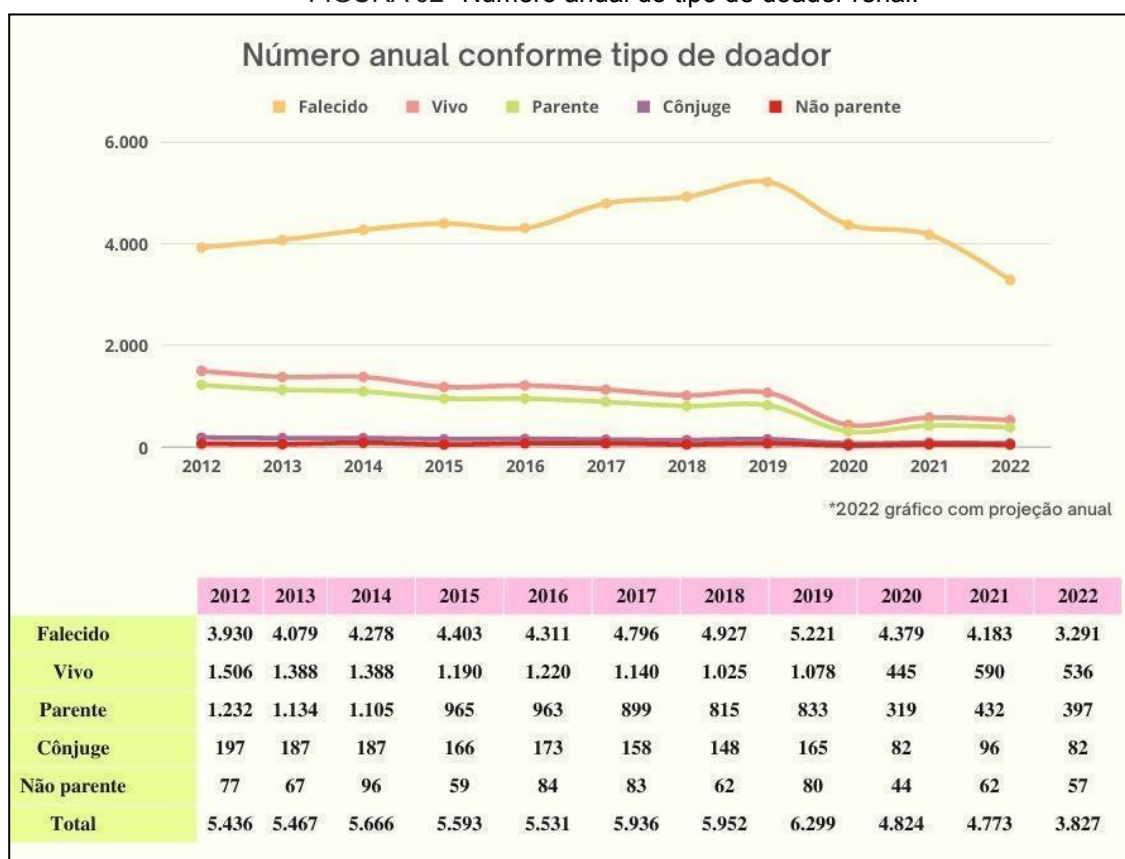
FONTE: Adaptado de Registro Brasileiro de Transplantes (2022)

O procedimento de transplante de rim é indicado para pacientes que apresentam um quadro grave de doenças renais, no qual o órgão está comprometido. Quando um paciente ingressa na fila de espera, se inicia um processo para encontrar um doador compatível. Um dos critérios para aceitação do órgão doado é a compatibilidade entre doador e receptor. Para isso são realizados testes e exames, dentre eles a tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) (SBN,2022).

As possibilidades existentes de doadores vivos são duas: vivos aparentados ou não aparentados, em ambas as situações as condições necessárias para ser um doador vivo é manifestar desejo espontâneo e voluntário, pois a comercialização de órgãos é proibida. Outra possibilidade é a de doador falecido, nesse caso, os órgãos são fornecidos após a confirmação de morte encefálica e com a autorização dos familiares (SBN,2022).

O registro brasileiro de transplantes, publicado em setembro de 2022, fornece o tipo de doador que mais ocorre no Brasil. Na FIGURA 02 há dados comparativos de 2012 a 2022 sendo possível observar que, para o transplante renal, o número de doadores predominante são os falecidos. Em 2022, chegou a 3.291 doações de falecidos, já para doadores vivos o número alcançado foi de 536 doações, distribuídas entre parentes, cônjuges e não parentes (ABTO, 2022).

FIGURA 02- Número anual do tipo de doador renal.



FONTE: Adaptado de Registro Brasileiro de Transplantes (2022).

O primeiro transplante renal documentado ocorrido com sucesso no mundo, foi realizado na década de 50 no hospital Peter Bent Brigham em Boston nos Estados Unidos pelo doutor Joseph Murray, o transplante ocorreu entre irmãos gêmeos idênticos (MURRAY et al., 1958). Já no Brasil o primeiro transplante de rim ocorreu em 1965 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram responsáveis pelo transplante os doutores Geraldo de Campos Freire e Emil Sabbaga. O paciente recebeu o rim de seu irmão e resultou em uma sobrevida de oito anos. Somente em 1968 foi criado o serviço de imunologia do transplante renal onde foram realizados os primeiros testes de tipagem HLA para acompanhamento pré e pós transplante (IANBEZ, 1994).

A doação de órgãos no Brasil teve seu início legal a partir da Lei nº 4.280 de 1963, que abordava apenas sobre a retirada de órgãos de pessoas falecidas, essa lei não estabelecia critérios técnicos para constatação da morte do doador, não falava sobre gratuidade e permitia que apenas um órgão fosse retirado de cada falecido. Em 10 de agosto de 1968, foi publicada a Lei nº 5.479 que surge com o progresso obtido na área de transplantes renais e de novos transplantes, a lei

aborda a disposição gratuita de uma ou várias partes do corpo do doador falecido, para fins terapêuticos. Somente em 1992 foi estabelecida a Lei nº 8.489, que autorizava a doação em vida, sendo que a disposição só poderia ser efetivada se os órgãos doados fossem duplos ou ainda, se as partes retiradas do corpo não gerassem prejuízo ou mutilação grave ao doador (FLORIM,2019).

Em 1997, foi aprovada a Lei nº 9.434 que permanece até os dias atuais no Brasil e contempla a remoção de órgãos, tecidos e medula óssea, para fins de transplante e tratamento. Em julho desse mesmo ano foi publicado o decreto nº 2.268 que constava a exigência da necessidade dos exames de compatibilidade em relação aos antígenos leucocitários humanos (BRASIL,1997). Em 2000 essa lei sofreu alterações e foram estabelecidos novos critérios para as metodologias utilizadas na realização da tipagem HLA. Para o transplante de rim ficou estabelecido que para a identificação de receptor e doador seria necessária a utilização de metodologias como a sorologia ou teste molecular de baixa resolução (BRASIL,2000).

Com os avanços das tecnologias, em 2021 foi publicada a portaria N° 684, de 16 de junho de 2021, que consiste na revisão dos critérios das metodologias de tipificação HLA para transplantes, estabelecendo estratégias de identificação e confirmação de tipagem HLA para doadores e receptores de órgãos, utilizando de metodologias de média e alta resolução. Na tipagem HLA para o transplante renal ficou estabelecido a identificação HLA por baixa e média resolução (BRASIL,2021).

Sabendo que atualmente no Brasil se utiliza somente metodologias de baixa e média resolução na tipagem HLA no transplante renal, o presente trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica de trabalhos que abordam utilização de metodologias de alta resolução para mostrar o impacto desta metodologia no transplante renal. A fim de compreender a sua importância, levantar possíveis vantagens e limitações do processo e instigar futuras pesquisas na área, incentivando a produção de estudos no campo.

2. PROBLEMA

Qual a impacto gerado pela genotipagem HLA com metodologias de alta resolução no transplante renal?

3. OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido visa como objetivos principais:

1. Identificar e analisar as vantagens e limitações no uso das metodologias de alta resolução no transplante renal.
2. Verificar o impacto dessas metodologias na sobrevida do enxerto renal e na qualidade de vida dos pacientes transplantados.
3. Compilação e discussão das informações acerca da sua importância para o transplante de renal.

4. JUSTIFICATIVA

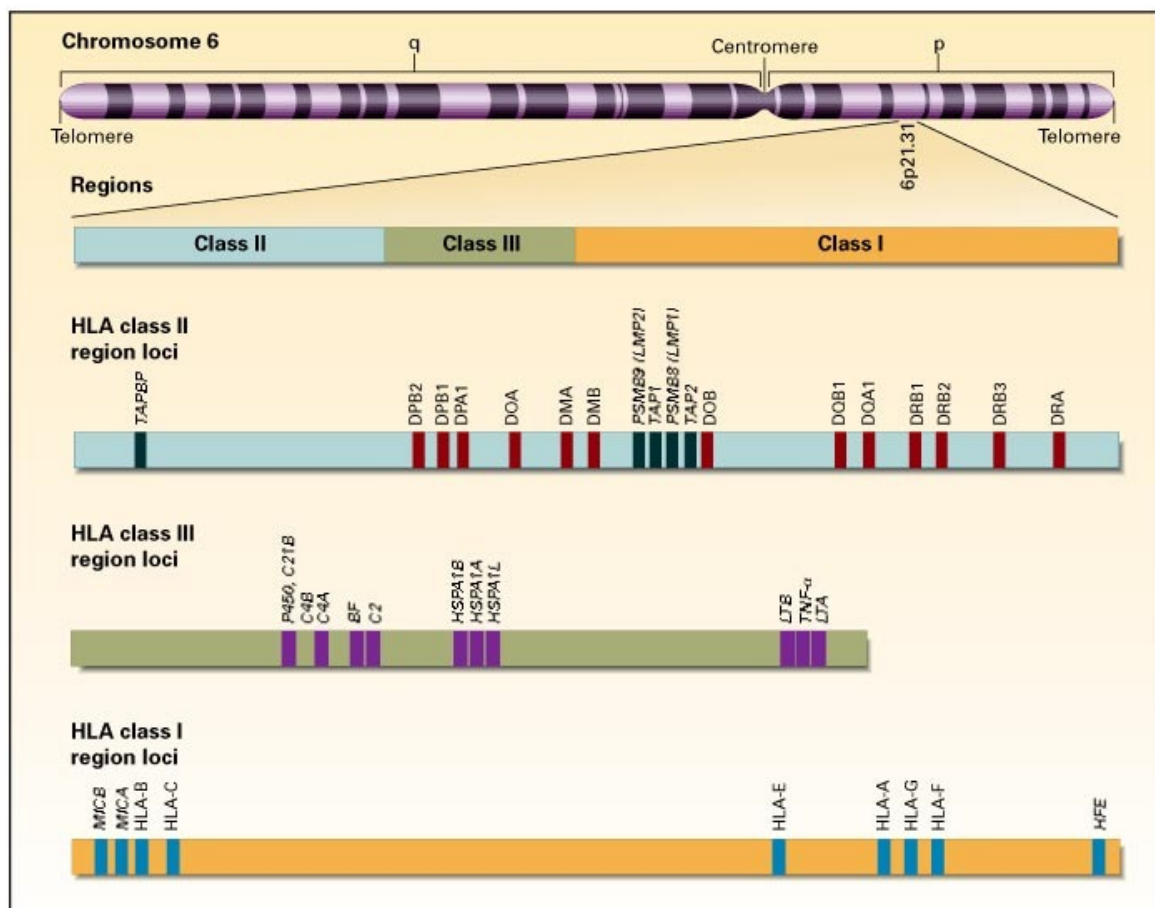
Como mencionado anteriormente, segundo o Registro Brasileiro de Transplantes, o rim é o órgão sólido, mais transplantado no Brasil e ao mesmo tempo possui a maior lista de espera por um transplante. Um dos motivos que contribui para essa longa espera é a necessidade de encontrar compatibilidade entre doador e receptor na tipagem HLA. Dessa forma a proposta deste estudo é realizar uma revisão bibliográfica de trabalhos que abordam a temática genotipagem HLA e metodologias de alta resolução a fim instigar seu uso no cenário do transplante renal.

5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1 ESTRUTURA DO SISTEMA HLA: GENES E PROTEÍNAS

O complexo principal de histocompatibilidade humano, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, é uma região cromossômica que possui aproximadamente 200 genes dos quais mais de 40 codificam antígenos leucocitários. Localizado no braço curto do cromossomo 6, representado na FIGURA 03, o MHC é dividido em três regiões denominadas de classe I, II e III (KLEIN e SATO, 2000). Em humanos o MHC é conhecido como Antígenos Leucocitários Humanos ou HLA (ROITT et al., 1999).

FIGURA 03- Organização gênica do complexo principal de histocompatibilidade humano



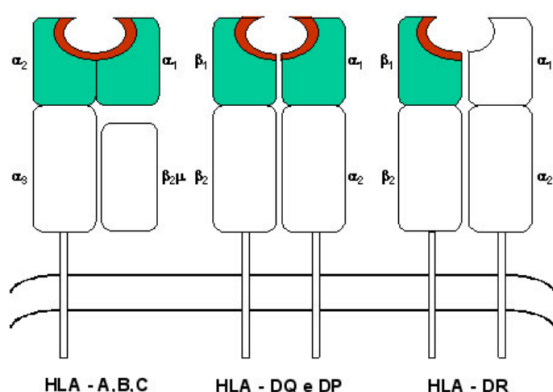
Localização e organização do complexo HLA no cromossomo 6. O complexo é dividido em três regiões: I, II e III. Os genes de classe I expressos são representados em azul, os da classe II são representados em verde e vermelho. Os genes de classe III, são representados pela cor lilás, e codificam produtos do sistema complemento e que participam da resposta inflamatória. FONTE: Klein e Sato (2000).

A região MHC de classe I, contém *loci* que codificam as proteínas HLA- A, -B, -C, -E, -F, -G, HFE, MICA e MICB. Os loci que codificam os antígenos *HLA- A, -B, e -C* são considerados clássicos, são polialélicos e polimórficos. Já os loci que codificam os antígenos HLA- E, -F, -G, HFE, MICA e MICB são chamados de não clássicos, com expressões menos variáveis na população. Os antígenos codificados a partir do MHC de classe I ocorrem na superfície de todas as células nucleadas (GOLDBERG E RIZZO, 2015).

O MHC de classe II possui loci que codificam as moléculas HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM e HLA-DO, e se localizam na porção mais centromérica do cromossomo. Assim como na classe I, também possuem genes clássicos com um elevado grau de polimorfismo, sendo estes os loci que codificam *HLA-DR, -DQ, -DP*. Os produtos do MHC de classe II são predominantemente expressos em células apresentadoras de antígenos profissionais, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e são reconhecidos por seu controle da resposta imunológica. Já os genes da classe III não estão relacionados com a classe I e II (GOLDBERG E RIZZO, 2015).

As moléculas HLA de classe I, - A, -B, ou -C, são compostas por cadeias α e β . A cadeia pesada α contém 3 domínios, α_1 , α_2 e α_3 , sendo maior a variabilidade nos domínios α_1 e α_2 . Já a β_2 -microglobulina é uma cadeia leve, considerada não polimórfica. As moléculas de classe II também são formadas por uma cadeia α e β , sendo a região com maior variabilidade os domínios α_1 das moléculas HLA-DQ e HLA-DP e domínios β_1 dos HLA-DR, DQ e DP, representados na FIGURA 04, (DONADI, 2000).

FIGURA 04- Estrutura das moléculas HLA classe I e II

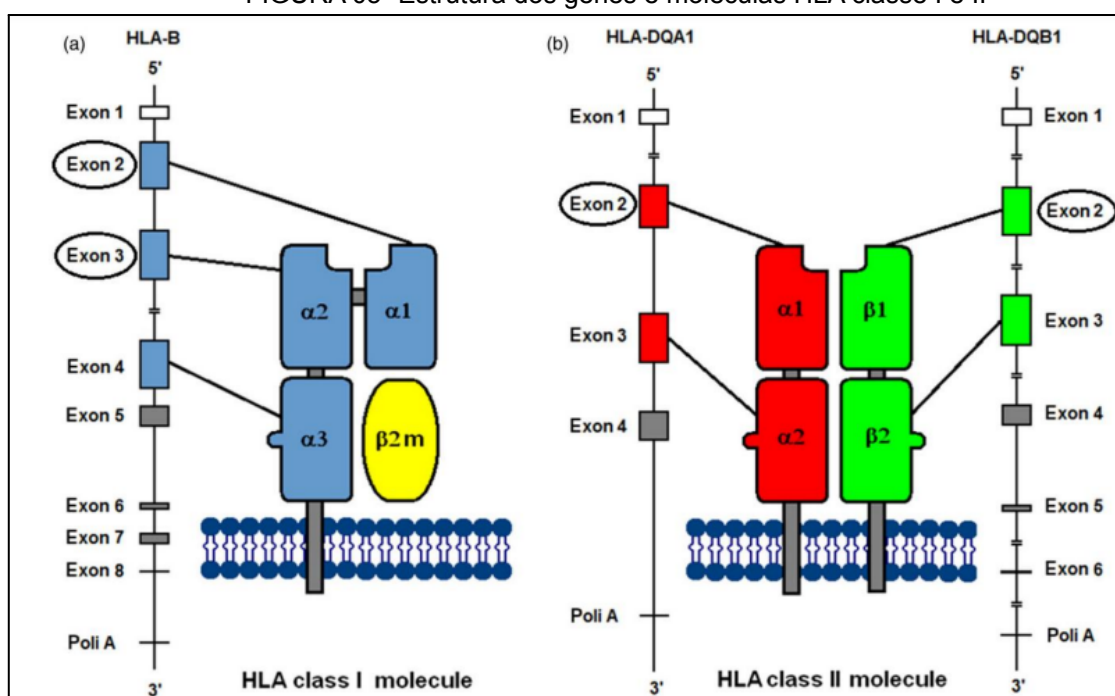


A figura representa as moléculas HLA de classe I e II. Todas são formadas por cadeias α e β . Em branco são os domínios menos variáveis, em verde, os mais variáveis. Em vermelho são as regiões da molécula responsável pela interação com antígeno. FONTE: Donadi (2000)

O polimorfismo e polialelismo nos genes que codificam as moléculas de HLA, resulta em uma diversidade em nível populacional. Uma consequência dessa variação é a dificuldade em encontrar compatibilidade entre doador e receptor em situações de transplante (MURPHY, 2010).

A maior variabilidade de sequência nos genes HLA são localizados nos éxons que codificam a fenda de ligação ao peptídeo. Os genes de classe I contêm oito éxons, sendo que os éxons 2 e 3 codificam os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$, respectivamente. Os genes de classe II possuem 6 éxons, sendo o éxon 2 é responsável por codificar domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$. A correspondência entre éxons e regiões codificadas por proteínas é mostrada na FIGURA 05, (GRUBIC, 2019).

FIGURA 05- Estrutura dos genes e moléculas HLA classe I e II

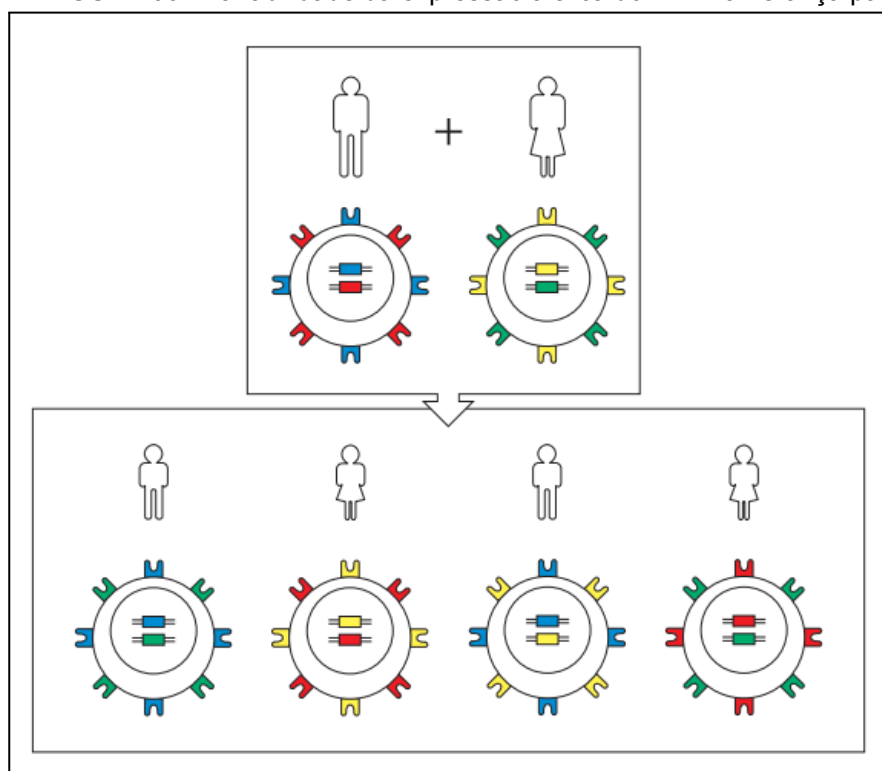


Os éxons 2 e 3 dos genes HLA classe I codificam a parte de ligação peptídica da molécula HLA classe I, que consiste nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. O éxon 2 dos genes HLA classe II, codifica a parte de ligação ao peptídeo da molécula HLA classe II, que consiste nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$. Todos os éxons que codificam domínios de ligação a peptídeos estão circutados, FONTE: Grubic (2019)

5.2 HERANÇA

A proximidade entre os genes MHC de classe I e II, resulta em combinações alélicas que são herdadas em conjunto em um único cromossomo; esse conjunto recebe o nome de haplótipo. Cada indivíduo herda um haplótipo de origem materna e outro paterno. Em uma mesma família os filhos podem apresentar diferentes combinações desses haplótipos herdados, resultando em irmãos haploides idênticos, não idênticos ou haploidênticos que compartilham 1 haplótipo (GAUCH,2015). Os genes MHC tem padrão de expressão codominante, gerando em um cruzamento de dois indivíduos heterozigotos, quatro combinações possíveis de haplótipos nos descendentes, como representado na FIGURA 06. Por essa razão, os irmãos normalmente diferem na expressão dos alelos do MHC (MURPHY, 2010).

FIGURA 06 - Variabilidade da expressão alélica do HLA na herança parental.

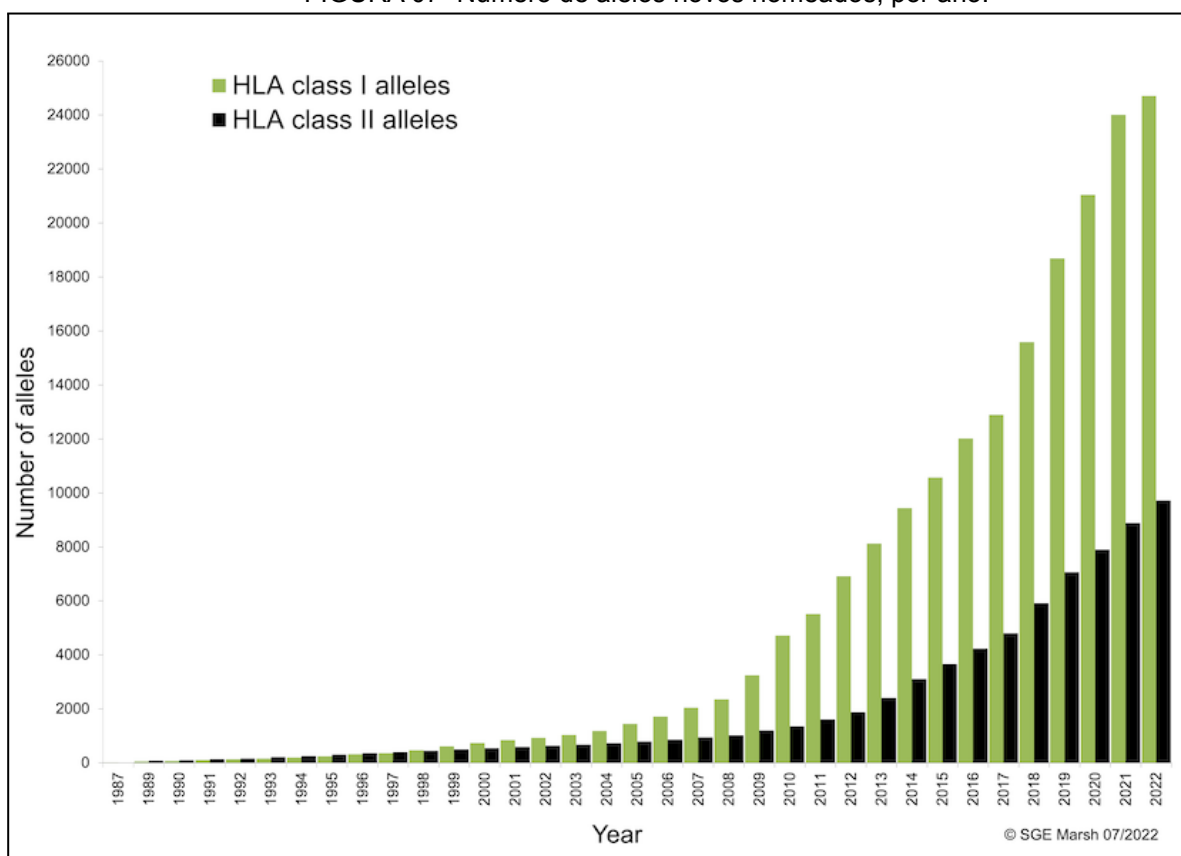


No quadrante superior há representação dos haplótipos do pai em vermelho e azul e os haplótipos da mãe em amarelo e verde. No quadrante inferior é possível observar a divergência de haplótipos herdados de cada um dos descendentes, FONTE: Murphy (2010).

5.3 NOMENCLATURA HLA

Em 1968, muitos alelos HLA foram analisados pelo Comitê de Nomenclatura da OMS para Fatores do Sistema HLA e foi estabelecida uma nomenclatura sistemática. A cada nova descoberta de alelos é realizada a manutenção e submissão dessas sequências do novo alelo no banco de dados IPD-IMGT/HLA que possui acesso público para serem analisadas pela comunidade acadêmica, clínica e público em geral. Desde o seu surgimento, o número de submissões ao banco cresce de forma exponencial, (MARSH et al., 2022). O crescimento de submissões de alelos no banco está representado na FIGURA 07.

FIGURA 07- Número de alelos novos nomeados, por ano.

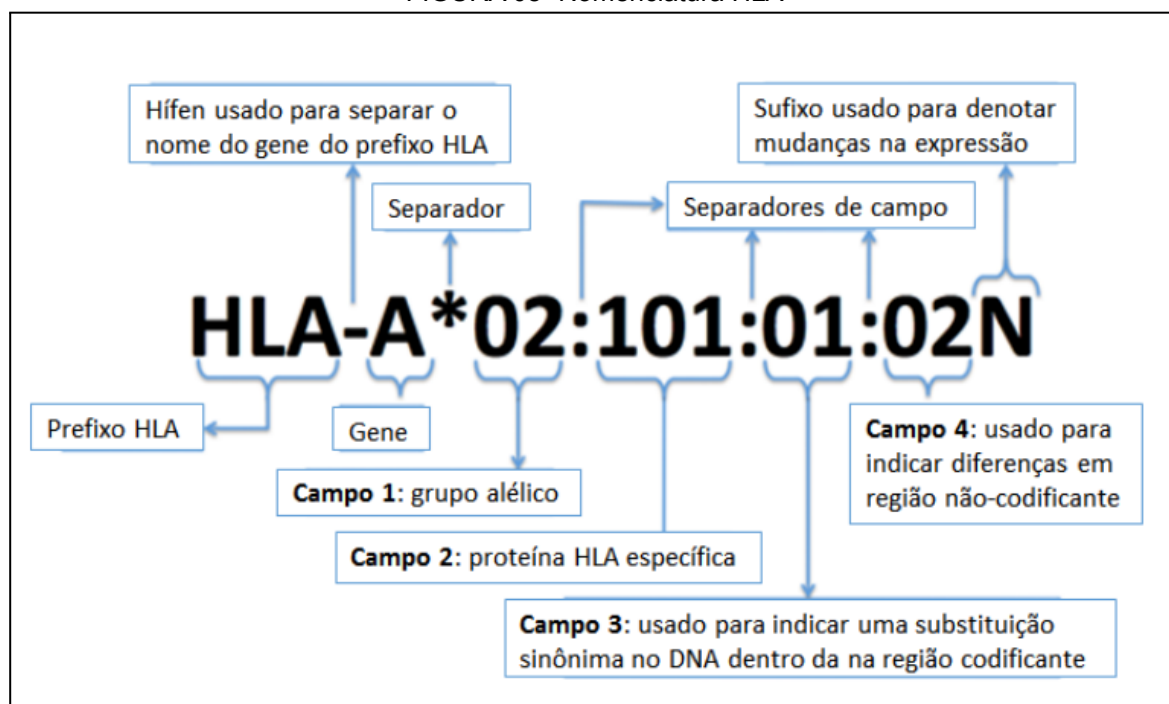


Número crescente de submissões de alelos novos à base do IPD-IMGT/HLA de 1997 a 2022, FONTE: Marsh et al., (2022).

A nomenclatura HLA ocorre de acordo com os seguintes critérios: se inicia com o prefixo HLA e a letra que determina o gene em questão, seguido de um separador representado por um asterisco. A seguir há quatro grupos de dígitos (campos) separados por dois pontos. O número do primeiro campo é o grupo do alelo (seu equivalente sorológico), o segundo número é a proteína HLA específica, o

terceiro número se refere a mutações silenciosas (sinônimas), e o quarto número são polimorfismos fora de regiões codificantes. Finaliza com sufixos usados para denotar mudanças na expressão (TORRES E MORAES, 2011). Sua representação está presente na FIGURA 08.

FIGURA 08- Nomenclatura HLA



FONTE: Adaptado de Marsh et al., (2010).

5.4 RESPOSTA IMUNE NO TRANSPLANTE

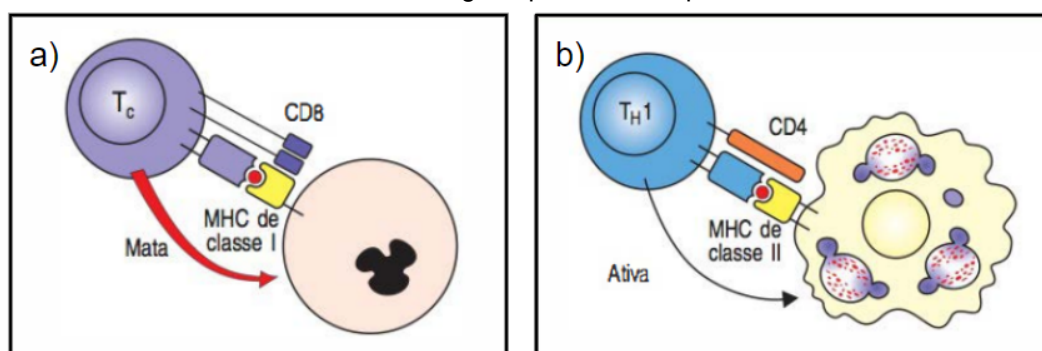
A resposta imunológica após um transplante é um processo dependente das células T (BARBOSA et al., 2020), que são responsáveis por realizar o reconhecimento dos peptídeos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (FIGURA 9). Esse reconhecimento ocorre pela via citosólica ou via endocítica (OLIVEIRA,2014).

Na via citosólica, as moléculas HLA de classe I associam-se a peptídeos endógenos ligados na fenda formada entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Esses peptídeos serão apresentados aos linfócitos T CD8+ que tem função citotóxica, capaz de matar as células infectadas por vírus ou por outros patógenos intracelulares ou células tumorais (OLIVEIRA,2014).

Na via endocítica, o peptídeo oriundo de um antígeno exógeno fagocitado pela célula, liga-se na fenda formada pelo domínio $\alpha 1$ e $\beta 1$ da molécula HLA classe II, e o complexo formado migra para a superfície da célula. Lá é apresentado aos linfócitos T CD4+ que possuem funções efectoras, todas envolvendo a produção de citocinas que agem sobre outras células do sistema imune. Dessa forma, os genes HLA classe I e II desempenham papel fundamental na resposta imune (OLIVEIRA,2014)

Essa resposta imune contra antígenos do enxerto recebido no organismo do receptor, pode desencadear uma rejeição ao órgão transplantado (PESTANA, 2014).

FIGURA 9: Reconhecimento do antígeno pela célula T por meio do MHC de classe I e II



Em (a) As células T CD8 (azul) reconhecem os antígenos apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (amarelo). (b) As células T CD4 (azul) reconhecem antígenos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (amarelo) FONTE: Adaptado de Murphy (2010).

5.5 TIPAGEM HLA

Os genes HLA clássicos, por serem polialélicos e polimórficos, requerem uma identificação adequada. Isso levou ao desenvolvimento contínuo de tecnologias práticas e viáveis para a tipagem no campo do transplante de órgãos e tecidos. As metodologias de tipagem HLA iniciaram a partir das técnicas sorológicas e evoluíram até as técnicas de sequenciamento de DNA (PICASCIA et al., 2016).

5.5.1 Método Sorológico

O teste de sorologia, consiste na determinação dos antígenos HLA expressos na membrana das células, a partir da reatividade celular entre antígeno e anticorpo anti-HLA correspondente. Ambos são incubados em placa, e uma vez que o antígeno é reconhecido pelo anticorpo, ocorre a ligação. Após essa reação, é adicionado um complemento que promove a lise celular. A finalização da reação acontece por meio de um corante, por exemplo, azul de *trypan*, brometo de etídio, que permite visualizar as células mortas por ação do complemento, uma indicação da especificidade antígeno-anticorpo. Para moléculas de classe I, utilizam-se linfócitos T, enquanto os linfócitos B são utilizados para tipificação das moléculas de classe II. Dessa forma é possível observar o resultado dessa reação em microscopia de fluorescência e diferenciar onde ocorreu ou não ligação do anticorpo *anti-HLA*, e, portanto, qual antígeno está sendo apresentado pela célula. Esse método possibilita um resultado rápido. Contudo, não é possível obter as especificidades dos alelos das células tipadas (SANTIS, 2018). Representação do método na FIGURA 10.

FIGURA 10: Tipificação de HLA por método sorológico



Tipificação de molécula HLA de classe I utilizando o teste de sorologia. Quando o anticorpo específico anti-HLA-B27 reage com a molécula HLA-B27 na superfície do linfócito, a célula é lisada após a adição do complemento. Anticorpos não específicos para os antígenos de superfície dos linfócitos não produzem lise celular. FONTE: Fernandes et al, (2003),

5.5.2 Diferenças nas metodologias de tipagem.

Os métodos moleculares de tipagem HLA são realizados a partir do DNA, seus resultados variam de acordo com o nível de discriminação alélica que cada metodologia fornece, na definição da sequência de nucleotídeos de um gene que codifica as moléculas HLA (BOUZAS, 2011). Quando a tipagem HLA identifica apenas grupos alélicos é considerado um método de baixa/média resolução. A metodologia que apresenta a definição alélica, como o sequenciamento de DNA que fornece até quatro campos é considerada metodologia de alta resolução (BOQUETT,2022). No QUADRO 01 é possível observar a diferença da discriminação de cada metodologia.

QUADRO 01: Exemplos de diferenças Nível de resolução de tipagem HLA das diferentes Metodologias

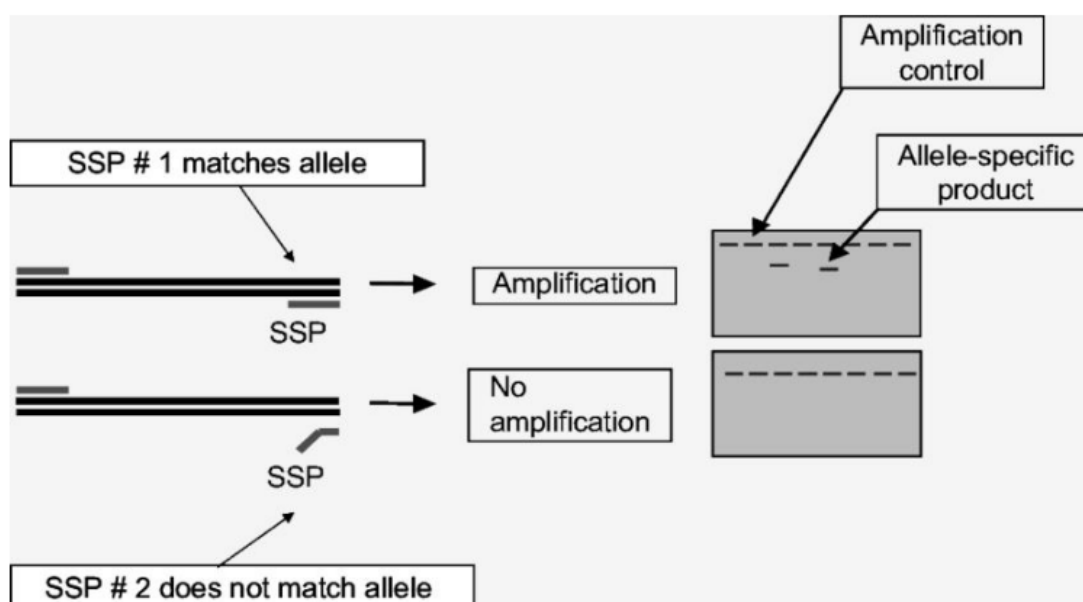
Metodologia	Nível de Resolução	Nível de Definição
PCR-SSP	Baixa resolução	HLA-A*13:02/13:36/13:67/13:96/13:100
PCR-SSO	Média resolução	HLA-A*13:02/13:36/13:96
SBT	Alta resolução	HLA-A*02:01:01:01
NGS	Alta resolução	HLA-A*02:01:01:01

FONTE: O autor (2023)

5.5.3 Método de tipagem por PCR-SSP

O teste molecular PCR-SSP (*Polymerase chain reaction-sequence-specific primers*) permite obter a tipagem HLA, a partir da reação de cadeia polimerase com primer da sequência específica do alelo a ser amplificado, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e a interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico (FIGURA 11). É uma técnica rápida, porém não é funcional quando se necessita analisar muitas amostras, sendo classificada como cobertura de baixa resolução (SANTIS,2018).

FIGURA 11: Tipagem HLA por metodologia de PCR-SSP



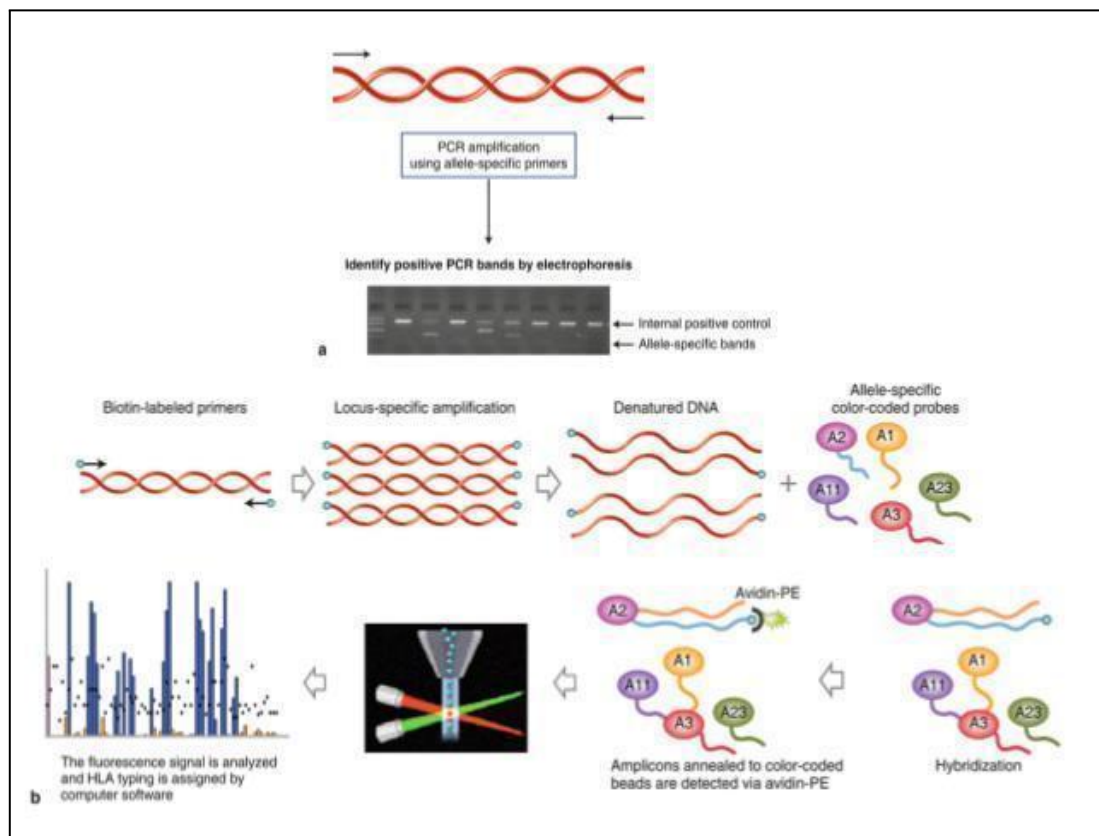
Após a amplificação da sequência específica do alelo é realizado um gel de agarose para analisar se houve amplificação. #1 A sequência foi amplificada e é possível observar pela banda formada. #2 A sequência não foi amplificada e é possível observar devido a ausência de banda no gel de agarose. FONTE: Creative Biolab (2023)

5.5.4 Método de tipagem por PCR-SSO

A metodologia de PCR-SSO (*Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*), (FIGURA 12) permite a amplificação de um grande número de amostras ao mesmo tempo e é capaz de genotipar grupos de alelos. O produto dessa amplificação é submetido a hibridação com sondas quimioluminescentes

(BONTADINI, 2012). É um método considerado de média/alta resolução pois depende do número de sondas analisadas, (PICASCIA et al., 2016).

FIGURA 12: Tipagem HLA por metodologia de SSO-PCR

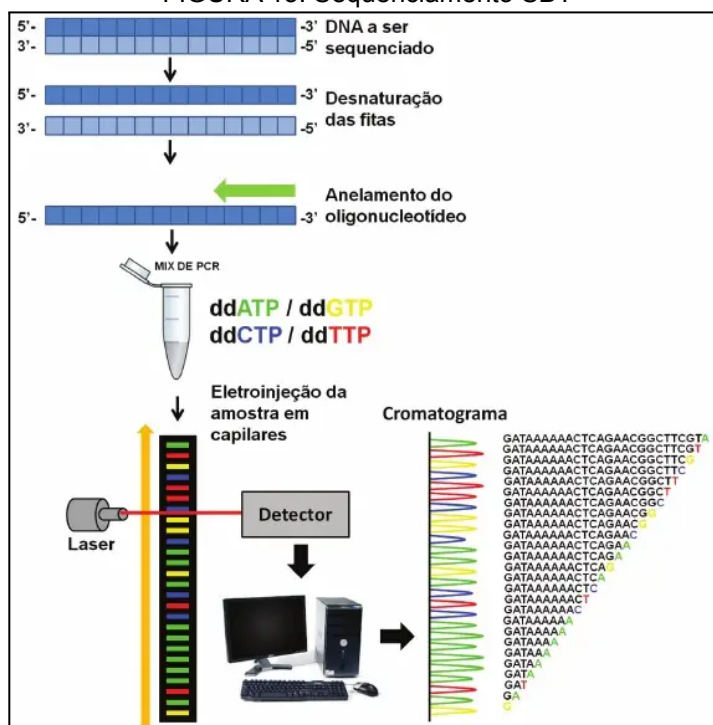


Tipagem de HLA por PCR- SSP. (a) Amplificação do DNA usando primers alelo-específicos conjugados com biotina, seguida de eletroforese em gel para analisar o padrão da amplificação. (b) As amostras de DNA amplificadas por PCR são desnaturadas e hibridizadas com sondas acopladas a esferas de poliestireno, marcadas com fluoróforos. São detectados por quimioluminescência e seus dados analisados em software. FONTE: Adaptado de Basic Medical Key e Labiskoma (2023)

5.5.5 Método de tipagem por SBT

A técnica pioneira das metodologias de tipificação de alta resolução, foi desenvolvida por Frederick Sanger, é baseada no sequenciamento do DNA é conhecida como SBT (*Sequencing Based Typing*), (ERLICH, 2015). após a amplificação por PCR, os diferentes fragmentos de DNA são automaticamente separados por eletroforese capilar e os nucleotídeos são identificados por fluorescência emitida (PICASCIA et al., 2016). Na FIGURA 13, é possível observar como a metodologia funciona.

FIGURA 13: Sequenciamento SBT



A técnica de SBT se baseia na amplificação da sequência de DNA a ser sequenciada após o processo de PCR, seu produto é sequenciado a partir da eletroinjeção da amostra em capilares e a sequência de bases detectadas por fluorescência emitida são representadas em um cromatograma. FONTE: Moreira (2015).

5.5.6 Método de tipagem por NGS

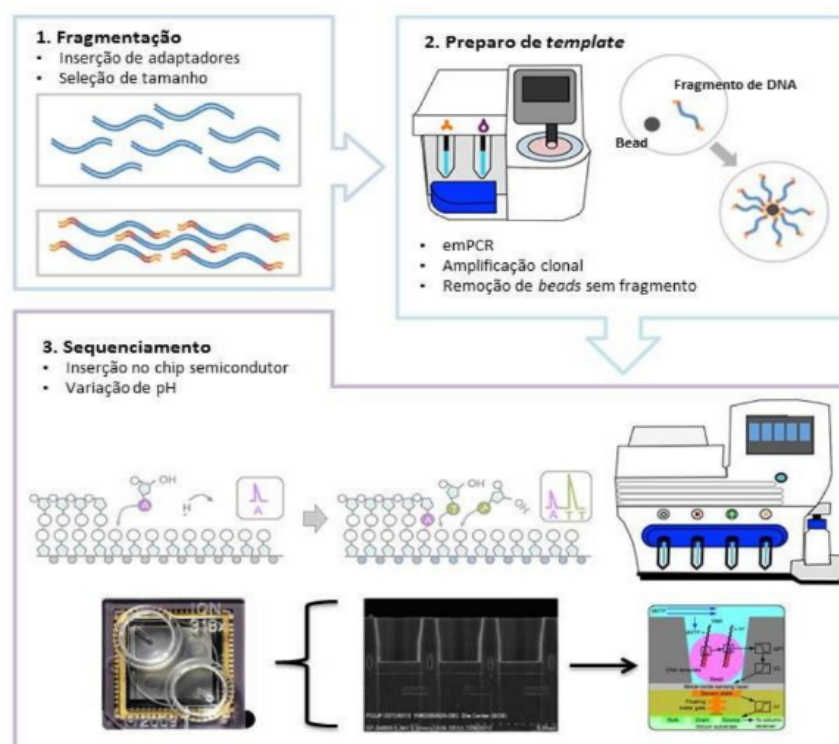
O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*), popularmente conhecido como NGS, garante uma melhor resolução dos resultados (ERLICH, 2015). O processo envolve várias etapas que podem ser realizadas por diferentes protocolos e plataformas, viabilizando variações no tempo, processamento da amostra, sequenciamento e análise. Contudo, independentemente da plataforma utilizada o requisito de preparo do DNA para NGS se baseia no preparo da amostra, a amplificação clonal da biblioteca, a execução do sequenciamento, onde cada plataforma realiza uma sequência de reações químicas que geram sinais para serem detectados, e os produtos destas reações, são convertidos em dados, que serão analisados (PICASCIA et al., 2016).

A escolha da plataforma de sequenciamento depende do volume da amostra, tempo, custo e fluxo de trabalho em um laboratório clínico. Atualmente, os sequenciadores comerciais mais usados no diagnóstico da tipagem HLA são tecnologias da Illumina e Thermo Fisher. Suas plataformas diferem no comprimento

de leitura do DNA, a capacidade de sequenciamento, custos de instalação, reagentes, tempo de bancada e sequenciamento (YIN, BUTLER, ZHANG, 2021).

Na FIGURA 14, é possível observar o fluxo da metodologia de sequenciamento utilizando a plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher), que realiza o sequenciamento de DNA com base em nucleotídeos dispensados. A amostra é inserida no equipamento dentro de um chip semiconductor, o qual é constituído por poços micrométricos nos quais *beads* com DNA serão depositados para sequenciamento. Na região inferior de cada poço existe um semiconductor capaz de detectar variações elétricas. Assim, o equipamento passa a fornecer os quatro nucleotídeos (Adenina, Citosina, Timina e Guanina) liberados, um de cada vez, nunca misturados, caso haja a incorporação de algum nucleotídeo em algum fragmento de DNA, a ligação fosfodiéster gerada libera íons de hidrogênio no meio, alterando o pH e fazendo com que essa variação seja detectada pelos semicondutores. Assim, sempre que houver o fornecimento de um nucleotídeo seguido de variação de pH, significa que aquela base foi incorporada, permitindo a geração de sequências ao final do processo (SILVA,2022).

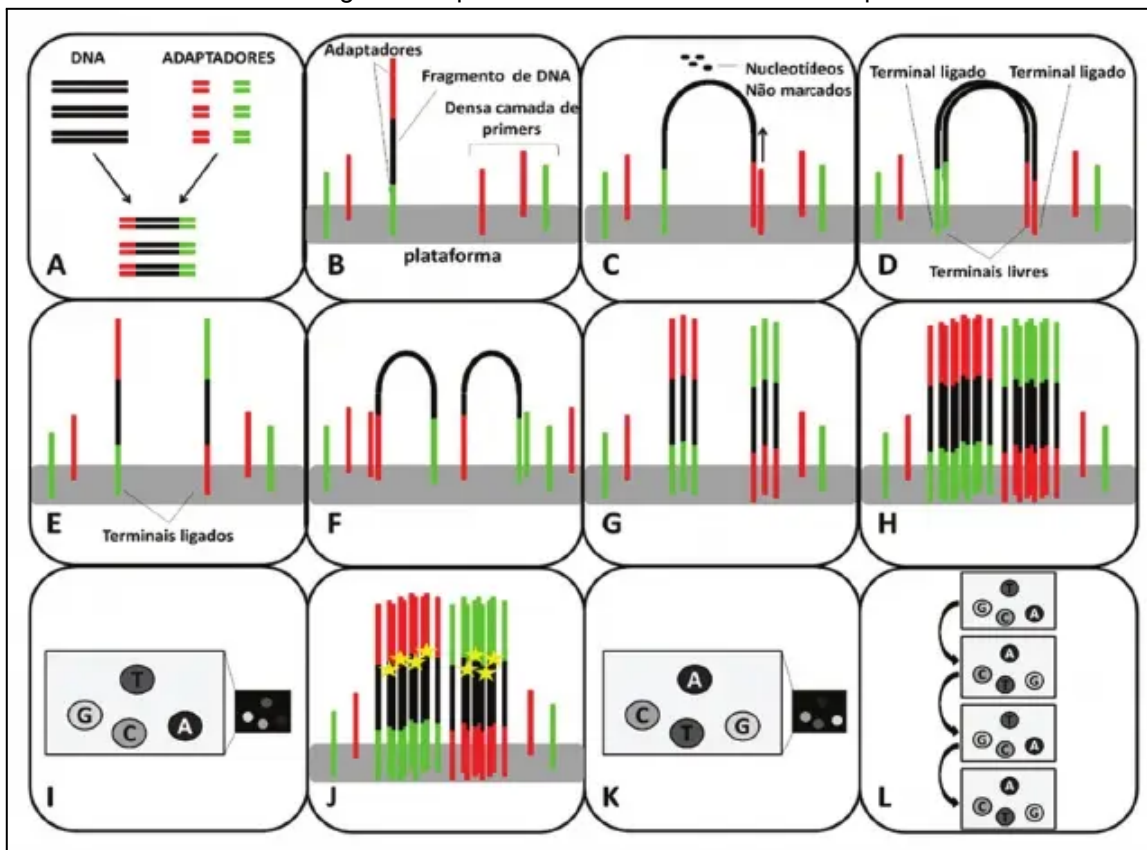
FIGURA 14: Sequenciamento de DNA utilizando plataforma Ion Torrent



Fluxo de sequenciamento utilizando a plataforma Ion Torrent se inicia com a fragmentação do DNA, seguida do preparo de biblioteca que consiste na ligação de beads ao DNA amplificado, após esse processo a amostra é inserida um chip e é realizado o sequenciamento a partir de incorporações de nucleotídeos dispensados. FONTE: Silva (2022).

Já na plataforma Illumina (FIGURA 15), a amostra a ser sequenciada é colocada em uma placa de vidro (*Flowcell*), que possui oligonucleotídeos complementares aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos de DNA. Os fragmentos então se ligam à placa e iniciam um processo de formação de *clusters* que ocorre pela incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até que toda a extensão dos fragmentos seja amplificada. Após esse processo adiciona-se os quatro tipos de nucleotídeos (A,C,T,G) contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação apropriada. A incidência de um feixe de raios laser excita os fluoróforos que absorvem e emitem em comprimento de onda diferente em função da base construída. Em seguida, efetuando-se a etapa de lavagem para remoção dos nucleotídeos não incorporados, e incorporação do próximo. Estes ciclos se repetem até que toda a extensão do DNA seja polimerizada. A cada ciclo ocorre o registro dos feixes de luz por meio de imagens, essas imagens são processadas e formam um banco de dados que será analisada em software (MOREIRA, 2015).

FIGURA 15: Metodologia de sequenciamento de DNA utilizando a plataforma Illumina



Em (a) ocorre o preparo da biblioteca, onde são incorporados na sequência de DNA adaptadores, estes fragmentos são colocados em uma placa de vidro (*flowcell*) (b) a *flowcell* contém adaptadores complementares aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos de DNA, de maneira

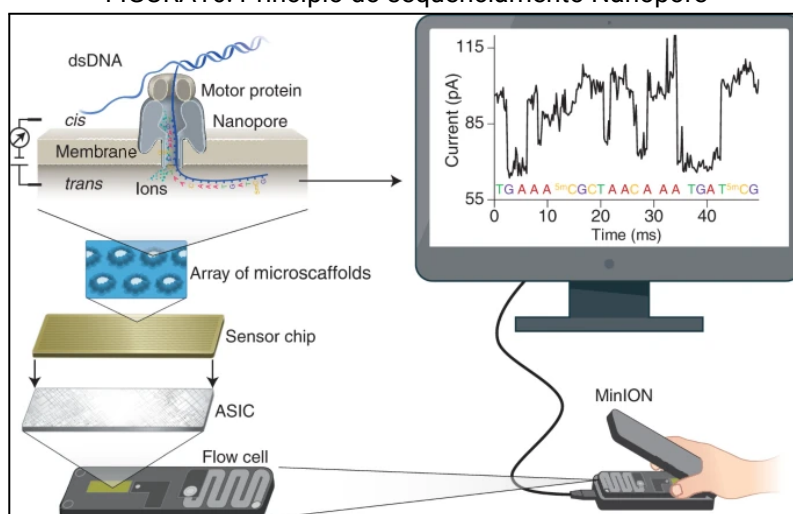
que os fragmentos se liguem à placa. Em (c), ocorre a incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até que toda a extensão do fragmento seja amplificada. Em (d) tem-se a formação da estrutura em ponte, também chamado de amplificação em ponte. Em (e) ocorre a desnaturação. Em (f) os adaptadores livres se ligam a adaptadores complementares na placa, iniciando um novo ciclo. Em (g), temos o cluster sendo formado, o qual provavelmente conterá mais de um milhão de cópias do mesmo fragmento. Em (h) adiciona-se os quatro tipos de nucleotídeos terminadores reversíveis contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do dideoxynucleotídeo apropriado. A incidência de um feixe de raios laser excita os fluoróforos que emitem luz que difere em função da base. Em seguida, efetuando-se a etapa de lavagem para remoção do grupo bloqueador presente na extremidade 3' junto com o fluoróforo; fato este que permitirá a incorporação do segundo nucleotídeo. Estes ciclos se repetem até que toda a extensão do DNA seja polimerizada. Em (i) ocorre o registro da imagem correspondendo a uma incorporação do primeiro dideoxynucleotídeo. (j) e (k) representam sucessivos ciclos de incorporação de dideoxynucleotídeos marcados, incidência de raios laser, emissão de luz e registro da imagem. Por fim, em (l), as imagens registradas em cada ciclo são decodificadas para determinar a sequência de bases de cada cluster na placa. FONTE: Moreira (2015)

5.5.7 Método de tipagem por sequenciamento de terceira geração

O sequenciamento de terceira geração é uma técnica avançada de leitura do DNA. Ele se diferencia dos métodos anteriores (sequenciamento de primeira e segunda geração) por sua habilidade em lidar com sequências longas e complexas de DNA, fornecendo informações precisas e detalhadas sobre a estrutura e a função dos genomas (EGANA, SANDERS E CHITNIS, 2021)

Um dos métodos de terceira geração é o sequenciamento do Nanopore (FIGURA 16), que possui a capacidade de ler longas sequências de DNA a partir da utilização de uma membrana sintética onde um poro, que pode ser de uma proteína de aproximadamente 1 nm de tamanho. Uma corrente iônica flui através do nanoporo e à medida que cada base de DNA passa, causa uma flutuação na corrente, essa alteração no sinal elétrico permite a identificação da base específica (EGANA, SANDERS E CHITNIS, 2021).

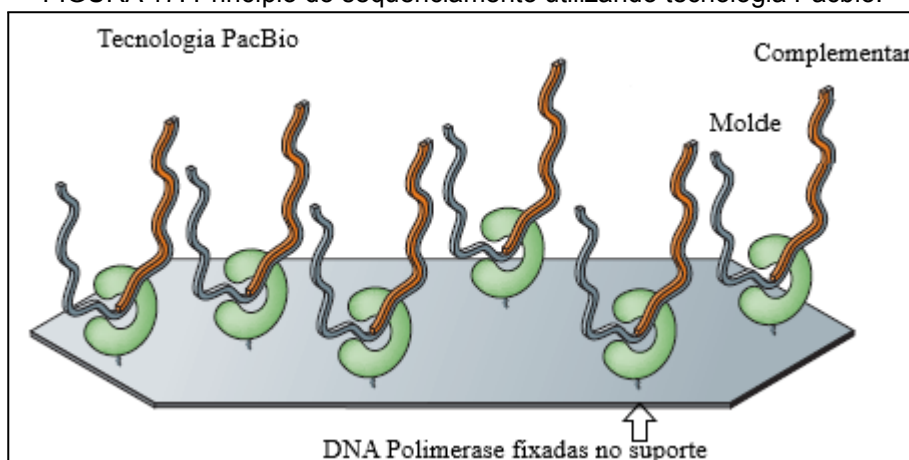
FIGURA16: Princípio do sequenciamento Nanopore



O sequenciamento nanopore consiste em um poro presente em uma membrana, que recebe a passagem de um DNA de fita simples, que por sua vez causa uma mudança de corrente permitindo a identificação da base. As informações são associadas a um eletrodo separado no chip do sensor e é controlado e medido individualmente pelo circuito de integração específico da aplicação (ASIC) construindo os dados a serem analisados. FONTE: Wang, Zhao, Bolas (2021)

Outro sequenciamento de terceira geração é o sequenciamento *Single Molecule Real Time* (SMRT), desenvolvido pela Pacific Biosciences (PacBio). O princípio da técnica utiliza múltiplos poços, cada um com uma DNA polimerase ligada ao fundo (FIGURA 17). Um sinal de fluorescência de um nucleotídeo marcado corresponde à adição de um nucleotídeo quando é adicionado à fita de DNA. Essas mudanças são registradas como informações para serem analisados posteriormente (YIN, BUTLER, ZHANGO, 2021)

FIGURA 17: Princípio do sequenciamento utilizando tecnologia Pacbio.



Podemos observar a fita de DNA molde presente nas polimerases que estão fixas em um suporte físico recebendo nucleotídeos que complementam a fita. FONTE: Bioinfo (2023)

6. METODOLOGIA

O presente trabalho tem como metodologia a revisão bibliográfica, acerca do tema proposto: metodologias de alta resolução na genotipagem HLA e transplante renal. A revisão bibliográfica obteve informações a partir de buscas em publicações periódicas em plataformas virtuais como Google acadêmico, Pubmed, Scielo e Science Direct. As palavras chave utilizadas no português foram; tipificação HLA, transplante renal, genotipagem HLA, genotipagem HLA de alta resolução, genotipagem HLA renal. Já nas buscas em inglês foram utilizadas as palavras; *hla typing, kidney transplant, high resolution typing*. Não houve parametrização em relação a data de publicação. O tipo de pesquisa foi exploratório, pois visa uma maior familiaridade com o tema proposto tornando-o mais compreensível.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no levantamento bibliográfico podem ser observados na TABELA 02, que traz o número de artigos encontrados em cada plataforma de busca de acordo com a palavra-chave. Não houve parametrização em relação a data de publicação, contudo o fato da temática, metodologias de alta resolução, ser um assunto recente, os artigos entre 2016 e 2022 foram os que abordaram informações relevantes para este estudo. A tabela também apresenta números elevados de resultados encontrados, em relação a algumas palavras-chave, mas nem todos os artigos encontrados possuíam o foco que este trabalho buscou para a análise.

TABELA 02: Resultados encontrados no levantamento bibliográfico em plataformas virtuais

	Google Acadêmico	Pubmed	Scielo	Science direct
Genotipagem HLA	1830	1	8	19
Tipificação HLA	2.440	Não encontrado	12	3
Transplante RENAL	44.200	62	522	2.096
Genotipagem HLA de alta resolução	746	Não encontrado	1	1
Tipificação HLA de alta resolução	374	Não encontrado	Não encontrado	Não encontrado
Genotipagem HLA renal	753	Não encontrado	Não encontrado	3
Tipificação HLA renal	586	Não encontrado	Não encontrado	Não encontrado
Hla typing	607.000	4.169	34	149.636
Kidney transplant	2.220.000	16.423	373	220,435
NGS	1.090.000	2.174	29	57,881

FONTE: O autor (2023)

Foram considerados para a análise, 9 artigos que abordam em seus estudos a tipagem no processo do transplante renal, metodologia de alta resolução, suas aplicações e limitações no processo pré e pós transplante. As publicações contemplam estudos dos Estados Unidos, Guatemala e Polônia. Os demais artigos

da busca, foram desconsiderados por apresentarem outras vertentes da temática que não se enquadram com os objetivos deste trabalho, como por exemplo o uso de terapias no processo pré e pós transplante ou a utilização de metodologias de alta resolução em outros diagnósticos médicos, como a oncogenética.

O primeiro trabalho corresponde ao risco de falhas no transplante relacionado a incompatibilidade de HLA. Com os avanços da tecnologia na área de transplantes, iniciou-se uma série de debates que levaram ao declínio da relação da importância do HLA na sobrevida do enxerto renal. Williams (2016) a fim de examinar as controvérsias, analisou o banco de dados do *Standard Transplant Analysis and Research* de 1987 a 2013 com 189.141 registros de transplantes de rim em adultos que receberam o órgão de um doador falecido. Seu objetivo foi relacionar os relatos de rejeição de transplante renal e suas causas com o grau de incompatibilidade HLA entre doador e receptor a partir de um modelo matemático. A conclusão de sua análise foi que há uma relação linear e significativa entre as rejeições de transplante renal e incompatibilidade HLA, afetando a sobrevida do enxerto transplantado. A ocorrência das rejeições existiu mesmo durante o aumento de sucessos no transplante renal. A análise ressalta também que a incompatibilidade independe dos loci *HLA*. Os resultados deste estudo contribuem com a importância de analisar a compatibilidade entre doador e receptor para que não ocorra rejeição do enxerto.

Com base na importância de existir compatibilidade entre doador e receptor no transplante renal, Weimer et al; (2016) realizaram uma comparação das metodologias de alta resolução SBT e NGS. A utilização da metodologia NGS se destacou, pois resultou em um alto rendimento do processamento das amostras, com exatidão e precisão nos resultados. Os autores ressaltam que a adoção da metodologia NGS em laboratórios clínicos de HLA resultam num melhor diagnóstico, contribuindo na redução da doença do enxerto, melhorando a sobrevida global do paciente após o transplante. O uso do NGS também reduz a taxa de resultados ambíguos, havendo a diminuição de custos pois não é preciso recorrer a outros testes de confirmação do resultado.

Para Egana, Sanders e Chitnis (2021) o sequenciamento de nova geração para a tipagem de HLA apresenta novas oportunidades, porém com desafios. No estudo foi realizada uma breve comparação entre as metodologias SSO, SSP, SBT e NGS (QUADRO 02), apresentando suas vantagens e desvantagens. Posteriormente

mencionam as tecnologias existentes para o NGS e a metodologia de terceira geração.

QUADRO 02: Diferença nas metodologias de tipagem HLA.

Método	Vantagens	Desvantagens
SSO	Kits baratos	Oferecem resolução baixa a intermediária; os kits de alta resolução normalmente liberam apenas um locus por vez e podem exigir confirmação por meio de método alternativo
	Tempo de bancada relativamente rápido (pode ser usado para tipagem de doadores falecidos)	Ambiguidades devido a oligos/sondas que não cobrem todos os polimorfismos
	Pode realizar várias amostras na mesma corrida	Os padrões de reação devem ser interpretados com uma lista limitada a alelos conhecidos
	Protocolo simples	Novos alelos só podem ser identificados se a novidade for detectável pelas sondas
		As execuções de amostra única perdem a relação custo-benefício
		O protocolo é suscetível a erros técnicos
SSP	Kits baratos	A maioria dos kits comerciais oferece baixa resolução; kits de alta resolução normalmente liberam apenas um locus por vez
	Mais rápido que o SSO (pode ser usado para tipagem de doadores falecidos)	Ambigüidades devido a primers que não cobrem todos os polimorfismos
	Não requer equipamentos caros	Os padrões de reação devem ser interpretados contra uma lista limitada a alelos conhecidos
	Dependendo dos primers utilizados, permite diferentes níveis de resolução	Novos alelos só podem ser identificados se a novidade for detectável pelos primers
		Protocolo trabalhoso
SBT	Alta resolução	Mais caro que SSO e SSP
	Capaz de sequenciar novos alelos, se a novidade estiver nos exons sequenciados	Requer mais tempo para processar
		Requer um sequenciador caro

Método	Vantagens	Desvantagens
SBT		Capaz de resolver certas ambigüidades, uma vez que a sequência hemizigótica completa nos éxons pode ser obtida, mas incapaz de definir a fase entre os polimorfismos; pode exigir confirmação por meio de método alternativo
		A maioria dos kits comerciais sequenciam apenas éxons ARS
NGS	Alta resolução	Fluxo de trabalho demorado
	Capaz de sequenciar novos alelos	protocolo complexo
	Capaz de resolver ambiguidades relacionadas ao faseamento	Atualmente não pode ser usado para tipagem de doadores falecidos
	Capaz de sequenciar exons e introns	Requer um sequenciador caro, bem como equipamento auxiliar
	Poucas ambiguidades permanecem	Requer infraestrutura de dados considerável e software sofisticado para lidar com armazenamento e análise de dados

FONTE: Adaptado de Egana, Sanders e Chitnis (2021)

Dentre as metodologias comparadas, o NGS se destaca por liberar resultados em alta resolução, sendo capaz de resolver ambiguidades e até mesmo sequenciar novos alelos. É eficiente na utilização da tipagem de doadores vivos, fornecendo uma resolução mais sofisticada de compatibilidade quando comparada com os métodos anteriores, eficiente também quando utilizado no acompanhamento pós transplante. Contudo possui limitações como um fluxo de trabalho demorado, alto custo, necessidade de software e banco de dados sofisticados para armazenamento e análise. Uma consequência é a não utilização da metodologia na tipagem de doador falecido pois o protocolo é muito extenso (EGANA, SANDERS E CHITNIS, 2021). Como no Brasil o maior índice de doação de órgãos é de doador falecido, fica inviável a aplicação da técnica na rotina laboratorial.

Os autores também abordaram as tecnologias de sequenciamento existentes de nova geração das plataformas Roche, Illumina, Ion Torrent e terceira geração das plataformas, Oxford Nanopore Technologies e PacBio. Em sua discussão as limitações existentes na metodologia de NGS, como a delimitações algorítmicas do software no processamento da amostra existente porque o DNA foi fragmentado para o sequenciamento, gerando áreas de perda de alelo, alta complexidade ou

homopolímeros. Tais limitações podem ser resolvidas com o sequenciamento de terceira geração, que abrange o sequenciamento de cadeias longas (*long reads*) superando os problemas encontrados no software ao interpretar a leitura dos nucleotídeos de uma única molécula, e relatam que tais tecnologias são promissoras para a utilização de sequenciamento de terceira geração no diagnóstico para a tipagem HLA. Por se tratar de sequenciamentos com protocolos mais versáteis podem futuramente ser utilizado na tipagem de doadores falecidos (EGANA, SANDERS E CHITNIS, 2021).

No mesmo ano, Yin, Butler, Zhango (2021), publicaram em seu trabalho que o sequenciamento de nova geração e o desenvolvimento da terceira geração possibilitam o aumento do conhecimento dos alelos e dos genes envolvidos na imunologia de transplantes. Isso é possível pois o sequenciamento contempla o haplótipo inteiro, inclusive regiões de intron e exons. Gerando resultados mais completos. Essenciais para o cuidado preciso do paciente pré e pós transplante. Contudo também afirmam que ainda há limitações no uso dessas metodologias pois existem taxas de erro de sequenciamento, bioinformática, interpretação de resultados e dificuldades com o grande armazenamento de dados que são gerados.

Com as novas tecnologias para tipagem HLA e detecção de anticorpos que continuam surgindo e evoluindo consideravelmente, se inicia uma nova era de diagnóstico e oportunidades terapêuticas no campo do transplante (PICASCIA et al., 2016).

Ingram et al., (2020), em sua publicação “NGS e HLA: um longo caminho pela frente” relatam que durante o período de tipagem de rotina de seu laboratório, utilizando a metodologia NGS, foram descobertos 28 novos alelos e mencionam a importância dos laboratórios clínicos desempenharem o papel de relatar e submeter as descobertas, a fim de ampliar o banco de dados IPD-IMGT/HLA, favorecendo na identificação de potenciais receptores e doadores renais em um âmbito mundial.

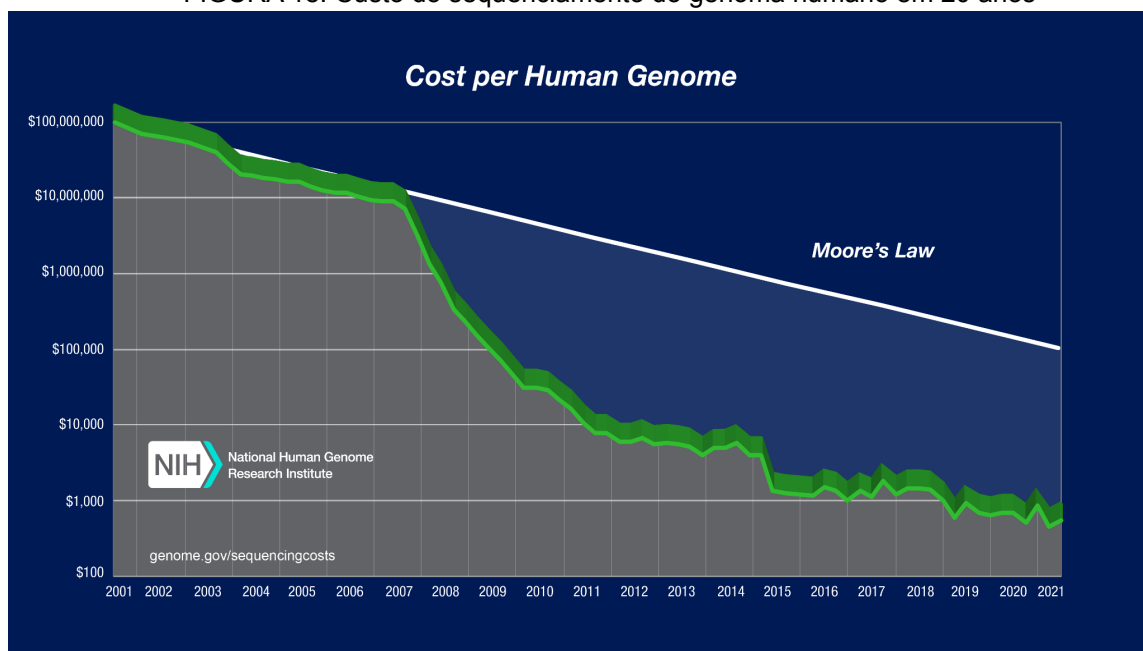
Já na pesquisa piloto de Kotowski (2018), menciona que o uso do NGS fornece dados capazes de associar a genotipagem dos alelos HLA a terapias de imunossupressores em pacientes com enxerto renal. Em seu estudo foram realizados o sequenciamento HLA de pacientes transplantados e seus resultados comparados com a farmacogenética de imunossupressores utilizados. Sua conclusão foi que para alguns alelos os pacientes estavam recebendo doses elevadas de imunossupressores e outro grupo de alelos os pacientes estavam

recebendo uma dosagem baixa. Logo se considera que a partir do diagnóstico da tipagem HLA no processo de transplante contribui para que os médicos estabeleçam protocolos de tratamento imunossupressor que sejam adequados com base nas necessidades individuais de cada paciente promovendo a redução nos efeitos colaterais ou evitar imunossupressão excessiva.

Mesmo em meio a avanços nas metodologias de tipagem, otimização de protocolos e novas tecnologias, existe um atraso dos avanços na utilização de metodologias de alta resolução. Na Guatemala, Castro (2022), motivado pela necessidade de caracterizar os perfis genéticos das populações latino-americanas, em seu estudo realizou a tipagem HLA por meio do PCR-SSO utilizando 127 amostras coletadas de 2018 a 2020 do programa de transplante renal do Hospital Geral San Juan de Dios (Cidade da Guatemala). As amostras apresentaram resultados de ancestralidade com diferentes frequências de etnias. Essa miscigenação é um obstáculo na busca de doadores HLA compatíveis. Por esse motivo o autor ressalta a importância de melhorar a caracterização genética e os bancos de dados do sistema HLA Latino-americanas que resultará na melhoria no rastreamento de doadores compatíveis na obtenção de órgãos (CASTRO,2022). Tomando como exemplo a Guatemala, a população Brasileira também possui um frequências diversas de etnia, resultante da sua colonização, sendo assim a formação do banco de dados de HLA também se torna primordial

Um cenário promissor para as melhorias na caracterização genética pode ser observado na publicação de Freitas e Pinto (2021), mencionando que as tecnologias de nova geração são uma ferramenta que permitiu e tem permitido enormes avanços no sequenciamento. Hoje, as técnicas disponíveis possuem tecnologias cada vez mais rápidas. Segundo uma estimativa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), em 2001 o custo para sequenciar 1 milhão de pares de bases era de 10 milhões de dólares, enquanto nos dias de hoje, após 20 anos, está custando aproximadamente 1 centavo de dólar (FIGURA 18). Seu barateamento e a facilidade de uso das diferentes plataformas tendem a ampliar cada vez mais seu uso e as suas aplicações.

FIGURA 18: Custo do sequenciamento do genoma humano em 20 anos



Custo do sequenciamento de um milhão de bases de DNA humano ao longo de 20 anos.
FONTE: genome.gov.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A portaria em vigência no Brasil, N° 684, de 16 de junho de 2021, aborda a composição das estratégias e metodologias utilizadas na identificação de doadores receptores de órgãos no país. Para o transplante renal, os procedimentos de tipagem HLA não contemplam as metodologias de alta resolução. Por esse motivo não há estudos no país com o uso dessas metodologias no diagnóstico HLA no processo de transplante renal.

Contudo os trabalhos mencionados relatam os impactos que as metodologias de alta resolução estão evidenciando internacionalmente. A utilização da tipagem pelos métodos de sequenciamento do DNA, usando principalmente NGS permite uma melhor compreensão das informações em nível alélico no diagnóstico do HLA. Com os avanços tecnológicos há um progresso na área dos transplantes, otimizando sua utilização no acompanhamento pré e pós transplante, trazendo benefícios aos pacientes, como a sobrevida do enxerto e auxílio em tratamentos e a utilização adequada de imunossupressores.

O desenvolvimento do sequenciamento de terceira geração resultou em vantagens significativas em relação aos métodos anteriores, como o sequenciamento de cadeias longas de DNA, importante para a compreensão de estruturas genômicas complexas. Esse método gera uma grande obtenção de dados em um curto período de tempo, sendo capaz de identificar mutações e variações com maior precisão e resolução, seu custo é elevado mas, pode ser um método promissor para o uso clínico e a implantação da sua utilização na genotipagem de doadores falecidos.

Além da tipagem HLA para o transplante, é possível utilizar das metodologias de alta resolução na caracterização genotípica da população Brasileira. Como mencionado no trabalho de Castro (2022) as populações Latino-Americanas possuem uma miscigenação alta, resultante de sua colonização. Essa miscigenação proporciona uma maior variabilidade dos genótipos das moléculas HLA, essa variabilidade resulta na demora para encontrar um doador compatível resultando nas filas de espera pelo órgão.

Espera-se que ocorra uma maior implementação das tecnologias sequenciamento em laboratórios de diagnóstico de rotina no Brasil e que as

próximas resoluções da legislação possam incluir também a genotipagem de alta resolução no processo da tipificação HLA para o transplante renal, proporcionando uma maior compatibilidade entre doador e receptor, assim como o acompanhamento do paciente que recebeu o enxerto. Com a redução dos custos do sequenciamento e surgimento de novas metodologias e tecnologias espera-se também que novos estudos nacionais possam ser sintetizados, trazendo mais contribuições para a genotipagem HLA da população Brasileira.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplante: dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro/Setembro – 2022. XXVIII Nº3** Disponível em: < <https://site.abto.org.br/publicacao/xxviii-no3/> >. Acesso em 05 de Dezembro de 2022.

BARBOSA, J. T, et al. Transplante renal: mecanismo de rejeição, terapia imunossupressora e métodos diagnósticos. **Caderno saúde e desenvolvimento**. v. 9 n. 17 de 2020. Disponível em: <<https://www.cadernosuninter.com/index.php/saude-e-desenvolvimento/issue/view/103>>. Acesso em 13 de novembro de 2022.

BASICMEDICAL KEY. Histocompatibility and Immunogenetics for Solid Organ Transplantation. Disponível em: <<https://basicmedicalkey.com/histocompatibility-and-immunogenetics-for-solid-organ-transplantation/>> Acesso em: 04 de Janeiro de 2023.

BIOINFO. Sequenciamento NGS: Status e perspectiva. Disponível em: <https://bioinfo.com.br/sequenciamento-ngs-status-e-perspectivas/>. Acesso em de fevereiro de 2023.

BONTADINI, A. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. **Methods**, v, 56, p. 471-76, 2012. Disponível em: DOI: [10.1016/j.ymeth.2012.03.025](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.025). Acesso em: 13 de novembro de 2022.

BOQUETT, JULIANO ANDRÉ. **Perfil HLA na população do Rio Grande do Sul : diversidade genética e potencial impacto na gestão de transplantes de medula óssea**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. 2017. disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/158219>> . Acesso em: 12 de novembro de 2022.

BOUZAS, L. F. S. **Análise da capacidade do REDOME/RENACORD em suprir as necessidades dos pacientes registrados no REREME**. Tese (Doutorado em Oncologia). Programa de Pós graduação em Oncologia/INCA Rio de Janeiro, 2011. Acesso: 04 de Janeiro de 2023.

BRASIL. **Portaria Nº 1.314, De 30 De Novembro De 2000**, Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2000/prt1314_30_11_2000.html#:~:text=EXCLUI%20DA%20TABELA%20DE%20PROCEDIMENTOS,uso%20de%20suas%20atribui%C3%A7%C3%B5es%20legais. Acesso em 02 de Novembro de 2022.

BRASIL. **Decreto Nº 2.268, De 30 De Junho De 1997**. Presidência da República. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1997/d2268.htm#:~:text=Regulamenta%20a%20Lei%20n%C2%BA%209.434,tratamento%2C%20e%20d%C3%A1%20>

[outras%20 provid%C3%Aancias.>](#) Acesso em 02 de Novembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de transplante**. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt>> Acesso em 16 de Setembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 684, de 16 de JUNHO de 2021**.

Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/Saes/2021/prt0684_18_06_2021.html#:~:text=Exclui%20procedimento%20e%20altera%20registro.do%20SUS%20referentes%20a%20Transplantes. Acesso em: 01 de Outubro de 2022.

CASTRO, K. E. et al. HLA molecular study of patients in a public kidney transplant program in Guatemala, **Human Immunology**, Volume 83, 2022, pg 741-748, ISSN 0198-8859, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.08.003>. Acesso em 09 de Janeiro de 2023.

CREATIVE BIOLAB. Sequence-specific Primer (PCR-SSP) Technology. Disponível em:

<https://www.creative-biolabs.com/sequence-specific-primer-pcr-ssp-technology.html> Acesso em: 04 de Janeiro de 2023.

DONADI, E. A. **Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças**.

Medicina (Ribeirão Preto), [S. l.], v. 33, n. 1, p. 7-18, 2000 Disponível em:

<https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/6503>. Acesso em: 12 nov. 2022.

DOI:10.11606/issn.2176-7262.v33i17-18.

EGANA V.B, SANDERS H, CHITNIS N, New challenges, new opportunities: Next generation sequencing and its place in the advancement of HLA typing, **Human Immunology**, Volume 82, 2021, pg 478-487, ISSN 0198-8859, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.01.010>. Acesso em 05 de Dezembro de 2022.

ERLICH, H. A. HLA typing using next generation sequencing: An overview. **Human Immunology**, v. 76, p. 887-890, 2015.

FERNANDES, A. P. M. et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 47, n. 5. pub 26 Jan 2004., pp. 601-611. ISSN 1677-9487.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000500015>. Acesso: 4 Janeiro 2023

FLORIM, F. S. **Revisão da legislação sobre o transplante renal no Brasil: Um guia para o profissional da saúde**. São José do Rio Preto, 2019 56 p.. Disponível em: <https://bdtd.famerp.br/browse?type=author&value=Florim%2C+Filipe+Silva>. Acesso em 13 de novembro de 2022

FREITAS A.S e PINTO H. B. Sequenciamento NGS: Status e Perspectiva.

GAUCH, C. R. **Diversidade de alelos e haplótipos HLA-A, -B e -DRB1 em uma amostra de candidatos a transplante renal no Brasil**. São José do Rio Preto, 2015. 74p. Disponível em: <http://bdtd.famerp.br/handle/tede/380>. Acesso em 11 de Novembro de 2022

GOLDBERG, A. C, RIZZO, L. V. **MHC structure and function – antigen presentation**. Part 1. Einstein, São Paulo. 2015, v. 13, n. 1 , pp. 153-156. ISSN 2317-6385. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3122>. Acesso 11 de Novembro de 2022.

GRUBIC, Z. (2019). **Human Leucocyte Antigens in blood transfusion**. ISBT Science Series. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/voxs.12514> . Acesso 26 de Dezembro de 2022.

IANBEZ L. E. Transplante Renal no Brasil: História evolução e problemas **atuais**. **Revista Brasileira de Nefrologia**. Volume XIV. Numero 1, Março de 1994. São Paulo

INGRAM K.J et al., NGS and HLA: The long road ahead, **Human Immunology**, Volume 81, 2020, Pg 280-284, ISSN 0198-8859, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.03.001> . Acesso em 14 de Janeiro de 2023.

KLEIN J; SATO A. **The HLA system. Second of two parts**. N Engl J Med. v. 343, n.11, p. 782-6. 2000b. Disponível em: DOI: [10.1056/NEJM200009143431106](https://doi.org/10.1056/NEJM200009143431106). Acesso em: 03 de novembro de 2022.

KOTOWSKI M., et al. The Importance of New Generation Sequencing (NGS) HLA Typing in Renal Transplantation: Preliminary Report, **Transplantation Proceedings**, Volume 50, Issue 6, 2018, Pages 1605-1615, ISSN 0041-1345, Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.05.005>> Acesso em: 17 de Novembro de 2022.

LABISCOMA. **HLA Typing**. Disponível em: <<http://www.labiskoma.co.kr/content/page.php?seq=11>> Acesso em: 04 de Janeiro de 2023.

MARSH, S.G.E, et al: **Nomenclature for factors of the HLA system**, 2010. Disponível em <<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>> Acesso em: 17 de Setembro de 2022.

MOREIRA. L. M. **Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2015. ISBN 978-85-89265-22-5.

MURRAY J.E, Merrill JP, Harrison JH. **Kidney transplantation between seven pairs of identical twins**. Ann Surg 1985;148:343. Disponível em: doi: [10.1097/00000658-195809000-00004](https://doi.org/10.1097/00000658-195809000-00004). Acesso em 10 de outubro de 2022.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**, 7ª edição. Porto Alegre, Artmed, 2010.

NIH. **The Cost of Sequencing a Human Genome**, 2020. Disponível em:

<<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>>. Acesso em 14 de Janeiro de 2023

OLIVEIRA, R. A. F. **Antígenos leucocitários humanos (HLA) na avaliação imunológica para a seleção de receptor-doador para transplantes**, Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUOS-9RQPJ8>> Acesso em 13 de Novembro de 2022.

OPELZ, G.; DÖHLER, B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*, Baltimore, v. 84, n. 2, p. 137-143. 2007. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000269725.74189.b9> Acesso em 02 de novembro de 2022

PICASCIA, A.; GRIMALDI, V.; NAPOLI, C. From HLA typing to anti-HLA antibody detection and beyond: The road ahead. **Transplantation Reviews**, v. 30, p. 187- 194, 2016. Disponível em: DOI: [10.1016/j.trre.2016.07.007](https://doi.org/10.1016/j.trre.2016.07.007). Acesso em 12 de Dezembro de 2022

PESTANA, JOSÉ OSMAR MEDINA DE ABREU, **Especialização em Nefrologia Multidisciplinar, Módulo 6 - Manejo Clínico Das Doenças Renais**, Universidade Federal do Maranhão. UNA-SUS/UFMA - São Luís, 2014 Disponível em: <<https://ares.unasus.gov.br/acervo/handle/ARES/2801>> Acesso em: 13 de Novembro de 2022.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo. Editora Manole. 1999.

SANTIS, J. O. **Frequência dos antígenos HLA classe I e II em pacientes indicados para transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP. – 2019** f. Monografia (Aprimoramento Profissional em Imunogenética) – Programa de Aprimoramento Profissional, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, FMRP, Universidade de São Paulo, 2019.

SILVA, R. C., et al. Principais métodos de sequenciamento de DNA. **Scientific Electronic Archives**, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.36560/15820221603>> Acesso em 07 de Janeiro de 2023.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Transplante Renal**. Disponível em: <https://www.sbn.org.br/orientacoes-e-tratamentos/tratamentos/transplante-renal> . Acesso em: 15 setembro. 2022

TORRES, M, MORAES M. E. Nomenclatura dos fatores do sistema HLA. **Avanços Médicos**. Einstein. São Paulo 9 (2) 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082011MD1914> . Acesso em: 17 de Setembro de 2022.

WANG Y, ZHAO Y, BOLLAS A. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. **Nature Biotechnology**, 2021, Volume 39, Number 11, Page 1348. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-021-01108-x>. Acesso

em 05 de fevereiro de 2023.

WILLIAMS, ROBERT C et al. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. ***Transplantation*** vol. 100,5 (2016): 1094-102. Disponível em: doi[10.1097/TP.0000000000001115](https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001115) Acesso em: 15 de Novembro de 2022.

WEIMER ERIC T., et al. Performance Characteristics and Validation of Next-Generation Sequencing for Human Leucocyte Antigen Typing. **The Journal of Molecular Diagnostics**. Elsevier. September 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.03.009>>. Acesso em 15 de Novembro de 2022.

YIN Y, BUTLER C, ZHANG Q, Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory, **Human Immunology**, Volume 82, Issue 11,2021,Pages 812-819,ISSN 0198-8859, Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.03.011>.> Acesso em: 18 de Novembro de 2022.