

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANNA PAULA VILLELA

IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA  
PARA OS TRANSPLANTES ALOGENEICOS DE CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOÉTICAS HAPLOIDÊNTICOS NO LABORATÓRIO DE  
IMUNOGENÉTICA DO CEMO/INCA

RIO DE JANEIRO

2019

ANNA PAULA VILLELA

IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA  
DE ANTICORPOS ANTI-HLA PARA  
OS TRANSPLANTES ALOGENEICOS  
DE CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOÉTICAS  
HAPLOIDÊNTICOS NO  
LABORATÓRIO DE  
IMUNOGENÉTICA DO CEMO/INCA

Volume 1

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação de  
Mestrado Profissional para Formação  
em Pesquisa Biomédica do Instituto de  
Biofísica Carlos Chagas Filho da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro visando a obtenção do grau de  
Mestre em Pesquisa Biomédica.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

RIO DE JANEIRO

2019

Villela, Anna Paula

Implementação da pesquisa de anticorpos anti-HLA para os transplantes alogeneicos de células-tronco hematopoéticas haploidênticos no laboratório de imunogenética do CEMO/INCA/ Anna Paula Villela – Rio de Janeiro, 2019.

100 f.

Orientador: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica, Programa de Pós-Graduação em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2019.

1.PRA. 2.HLA. 3. transplante haploidêntico de células-tronco hematopoiéticas. I.Abelhay, Eliana Saul Furquim Werneck, orient. II. Implementação da pesquisa de anticorpos anti-HLA para os transplantes alogeneicos de células-tronco hematopoéticas haploidênticos no laboratório de imunogenética do CEMO/INCA.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A Dr<sup>a</sup> Eliana Abdelhay pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão e admiração.

A todos os amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos menos fáceis. Em especial a Matilde Romero, Christina Nogueira, Cristina Pereira e Gabriela Lemos.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais e meu avô por todo o apoio com meus filhos, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida acadêmica, bem como, à elaboração da presente tese a qual sem o apoio teria sido impossível.

Ao meu marido, Carlos Eduardo Matias por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda prestada durante a elaboração da presente dissertação, especialmente pelos cuidados com os nossos filhos, nos períodos de ausência, quando sacrificava os dias, as noites, os fins-de-semana e os feriados em prol da realização deste estudo.

## RESUMO

Villela, Anna Paula. Implementação da pesquisa de anticorpos anti-HLA para os transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas haploidêntico no Laboratório de Imunogenética do CEMO/INCA. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação de Mestrado Profissional para Formação em Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O transplante alogeneico de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) haploidêntico vem sendo cada vez mais utilizado para o grupo de pacientes que encontra-se em progressão e agravamento da doença de base, sem tempo de espera por um doador 100% HLA compatível. Neste caso, a pesquisa de anticorpos anti-HLA torna-se de extrema importância para evitar complicações pós-transplante como a DECHa e rejeição. Atendendo a crescente demanda do Centro de Transplante de Medula Óssea do INCA para este tipo de transplante, fez-se necessário a adaptação do protocolo e implementação da metodologia para detecção de anticorpos anti-HLA através do painel de reatividade (PRA) na plataforma Luminex no intuito de fornecer informações complementares para auxiliar no protocolo clínico no pré e pós TACTH haploidêntico. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas: (1) validação do kit comercial *Labscreen*<sup>TM</sup> para o teste PRA (painel de reatividade a anticorpos), (2) validação da utilização do plasma como fonte de amostras para os ensaios, (3) validação das especificidades de ligação, (4) obtenção da certificação de aptidão para realização do teste PRA pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade (ABH) e (5) implementação do teste PRA na rotina do laboratório. Para a validação do kit *Labscreen*<sup>TM</sup> nas etapas de triagem (com o kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Mixed*) e especificidade (kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Single Antigen*) foram testadas 10 amostras de soro conforme o protocolo do fabricante. Foi verificado consenso entre os testes nos parâmetros controles positivos, negativos e NBG (razão de *Background* normalizado). Os resultados obtidos tanto na etapa de triagem quanto na especificidade foram concordantes entre os laboratórios. Na validação do plasma foram testadas seis amostras simultaneamente com as de soro, com a finalidade de identificar se a quantidade de EDTA presente no tubo comercial era suficiente para evitar o efeito prozona. Os resultados apresentados após a realização do teste foram concordantes com os encontrados nas amostras de soro tratada com o EDTA. Nos testes de especificidades de ligação observamos que amostras tratadas com o reagente *adsorb out* tiveram um resultado nos controles positivos e negativos significativamente melhores quando comparados com as sem o pré tratamento. Para a certificação da ABH, o laboratório de Imunogenética do INCA participou do teste de proficiência do controle de qualidade da ABH nos anos de 2017 e 2018. No total 12 amostras de soro chegaram ao laboratório e foram realizados os testes de PRA nas duas etapas (triagem e especificidade). Os resultados obtidos de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ABH foram satisfatórios para as duas etapas, alcançando o desempenho excelente. Durante o período de setembro de 2017 até junho de 2019 foram realizados 85 testes PRA nos pacientes candidatos ao TACTH haploidêntico, deste total apenas 36 realizaram o transplante e nenhuma complicação pós transplante foi relacionada com os anticorpos anti-HLA.

Palavras-chave: HLA, PRA, Transplante de células-tronco hematopoiéticas, Transplante haploidêntico

## **ABSTRACT**

Villela, Anna Paula. Implementation of anti-HLA antibody screening for allogeneic haploidentical hematopoietic stem cell transplant at the CEMO / INCA Immunogenetics Laboratory. Rio de Janeiro, 2019. Professional Master Thesis for Training in Biomedical Research Biophysical Institute Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro.

The allogeneic haploidentical haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been increasingly used for the group of patients who are progressing and worsening their underlying disease, with no waiting time for a 100% HLA-compatible donor. In this context, the search for anti-HLA antibodies becomes of utmost importance for the clarification of a post-transplantation such as a GVHD and rejection. Given the growing demand from INCA's Bone Marrow Transplant Center for this type of transplant, it was necessary to adapt the protocol and implement the methodology for detecting anti-HLA antibodies via the panel reactive (PRA) on the Luminex platform. There is no clinical protocol before and after haploidentical HSCT. To achieve this goal, the following steps were achieved: Labscreen™ test kit validation for plasma plate acceptance testing and also binding specification validation; Brazilian Histocompatibility (ABH) test aptitude certification, and PRA test implementation in the laboratory routine. For validation of the Labscreen™ kit in the screening steps (with the Labscreen™ Mixed kit) and specificity (Labscreen™ Single Antigen kit), 10 serum samples were tested according to the manufacturer's protocol. What was consensus among the works were the positive, negative and NBG controls (normalized background ratio). The results obtained were in the screening stage regarding the specificity of the concordants between the laboratories. In the plasma validation, samples were tested at the same time, in order to identify the amount of EDTA present at the commercial time necessary to avoid the prozone effect. Results were listened for data storage in accordance with EDTA. In the binding specificity tests, they observe that samples treated with reagent adsorb, are obtained as previous results. For ABH certification, the INCA Immunogenetics Laboratory conducted the ABH quality control proficiency test in 2017 and 2018. screening and specificity). The results obtained according to the standards established by ABH were satisfactory for both phases, achieving excellent performance. From September 2017 to June 2019, 85 PRA tests were performed on haploidentical HSCT patients, out of which only 36 performed with transplantation and did not respond post-transplantation with anti-HLA.

Key words: HLA, PRA, Hematopoietic Stem Cell Transplant, Haploidentical Transplant

# SUMÁRIO

## **1. Introdução**

|  |           |
|--|-----------|
| 1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade   | 1         |
| 1.1.1. Estruturas das moléculas HLA  | 4         |
| 1.1.2 Funções das moléculas HLA  | 6         |
| 1.2 Transplante de célula-tronco hematopoiética  | 7         |
| 1.2.1 Transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas  | 9         |
| 1.2.2 TACTH haploidêntico  | 10        |
| 1.3 Etapas do TACTH  | 12        |
| 1.4 Imunologia dos transplantes  | 14        |
| 1.4.1 Reconhecimentos de Antígenos   | 14        |
| 1.5 Anticorpos   | 16        |
| 1.5.1 Estrutura e Função   | 16        |
| 1.5.2 Formação dos Anticorpos anti-HLA   | 17        |
| 1.6 Complicações nos Transplantes  | 19        |
| 1.7 Metodologias aplicadas para detecção de anticorpos anti-HLA através do Painel de Reatividade de Anticorpos | 21        |
| <b>2. Justificativa</b>  | <b>22</b> |
| <b>3. Objetivo</b>   | <b>23</b> |
| 3.1 Objetivos específicos  | 23        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. Materiais e métodos</b>   | <b>24</b> |
| 4.1 Desenho do estudo   | 24        |
| 4.2 ETAPA1: Validação do kit <i>Labscreen™</i> no Laboratório com o laboratório de referência JRM - Investigações Imunológicas.           | 25        |
| 4.2.1 Protocolos para o KIT <i>LABScreen™</i> ( <i>ONE LAMBDA</i> )   | 25        |
| 4.3 ETAPA 2: Validação das amostras de plasma   | 29        |
| 4.4 ETAPA 3: Validação das especificidades de ligação   | 29        |
| 4.5 ETAPA 4: Certificação de aptidão para realização do teste PRA pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade                      | 30        |
| 4.6 ETAPA 5: Implementação da rotina do teste PRA na rotina do laboratório  | 30        |
| <b>5. Resultado</b>   | <b>32</b> |
| 5.1 ETAPA 1: Validação do kit comercial <i>Labscreen™</i> no laboratório com o laboratório de referência JRM- Investigações Imunológicas. | 32        |
| 5.2 ETAPA 2: Validação das amostras de plasma   | 36        |
| 5.3 ETAPA 3: Validação das especificidades de ligação   | 39        |
| 5.4 ETAPA 4: Certificação de aptidão para realização do teste PRA pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade                      | 46        |
| 5.5 ETAPA 5: Implementação do teste PRA na rotina do laboratório  | 52        |
| <b>6. Discussão</b>   | <b>54</b> |
| <b>7. Conclusão</b>   | <b>57</b> |
| <b>8. Referências Bibliográficas</b>  | <b>58</b> |

Anexos

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).   | 3  |
| Figura 2: Estrutura molecular do MHC classe I.  | 4  |
| Figura 3: Estrutura molecular do MHC classe II  | 5  |
| Figura 4: Localização do MHC no cromossomo 6.   | 6  |
| Figura 5: Processo de decisão entre Transplante alternativo.  | 12 |
| Figura 6: Representação esquemática do processo de TACTH  | 14 |
| Figura 7: Alorreatividade direta e Indireta   | 16 |
| Figura 8: Estrutura e função do anticorpo.  | 17 |
| Figura 9: Etapas do processo de implementação do teste PRA  | 25 |
| Figura 10: Tela de análise do Software HLA Fusion (ONE LAMBDA) com o kit Labscreen™ mixed   | 27 |
| Figura 11: Tela de análise do Software HLA Fusion (One Lambda) com o kit Labscreen™ Single Antigen (One Lambda)   | 28 |
| Figura 12: Comparação entre os resultados obtidos entre os laboratórios (INCA e JRM) em relação aos controles positivos e negativos na etapa de triagem   | 33 |
| Figura13: Comparação entre os resultados obtidos entre os laboratórios (INCA e JRM) em relação a reatividade dos anticorpos anti-HLA calculado a partir do NBG (razão de Background normalizado) do teste PRA | 34 |
| Figura 14: Comparação entre os resultados encontrados entre os laboratórios (INCA e JRM) referentes a cada amostra testada para o HLA classe I e classe II na etapa de triagem                                | 34 |
| Figura 15: Comparação entre os percentuais de anticorpos encontrados para o HLA classe I e II entre os laboratórios (INCA e JRM)  | 35 |

|  |    |
|--|----|
| Figura16: Comparação entre os resultados encontrados entre os laboratórios (INCA e JRM) referentes a cada amostra testada para o HLA classe I e classe II na etapa de especificidade de anticorpos anti-HLA.   | 35 |
| Figura 17: Comparação entre os resultados obtidos entre as amostras de soro e Plasma em relação aos controles positivos e negativos na etapa de triagem  | 37 |
| Figura 18: Comparação entre os resultados obtidos entre as amostras de soro e plasma em relação a reatividade dos anticorpos anti-HLA calculado a partir do NBG (razão de Background normalizado) do teste PRA | 37 |
| Figura 19: Comparação entre os resultados encontrados entre o soro e plasma referentes a cada amostra testada para o HLA classe I e classe II na etapa de triagem  | 38 |
| Figura 20: Comparação entre os valores de controle positivo e negativo das amostras de soro e plasma na etapa de especificidades   | 38 |
| Figura 21: Comparação entre os resultados encontrados entre o soro e plasma referentes a cada amostra testada para o HLA classe I e classe II na etapa de especificidade                                       | 39 |
| Figura 22: Comparação dos resultados finais das amostras de plasma com e sem adsorb out na etapa de triagem  | 42 |
| Figura 23: Resultados reportados do controle de qualidade da ABH 2017, etapa de triagem  | 47 |
| Figura 24: Resumo dos resultados reportados e o consenso entre os laboratórios participantes   | 47 |
| Figura 25: Resultado do desempenho global do teste PRA na etapa de triagem e especificidade  | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Principais doenças hematológicas neoplásicas e não neoplásicas indicadas ao transplante de células-tronco hematopoéticas. | 8  |
| Tabela 2: Modalidades de transplante de células-tronco hematopoiéticas  | 8  |
| Tabela 3: Painel de antígenos HLA classe I reportados para ABH do Controle de qualidade   | 49 |
| Tabela 4: Painel de antígenos classe II reportados para ABH do Controle de qualidade  | 51 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1: Representação dos controles positivos das amostras testadas com e sem <i>adsorb out</i> na etapa de triagem.                    | 40 |
| Gráfico 2: Representação dos controles negativos das amostras testadas com e sem <i>adsorb out</i> na etapa de triagem.                    | 40 |
| Gráfico 3: Representação dos valores de NBG do HLA classe I das amostras testadas com e sem <i>adsorb out</i> na etapa de triagem.         | 41 |
| Gráfico 4: Representação dos valores de NBG do HLA classe II das amostras testadas com e sem <i>adsorb out</i> na etapa de triagem.        | 41 |
| Gráfico 5: Representação dos anticorpos HLA classe I detectados nas amostras com e sem o tratamento com o reagente <i>adsorb out</i> .     | 44 |
| Gráfico 6: Representação dos anticorpos HLA classe II detectados nas amostras com e sem o tratamento com o reagente <i>adsorb out</i> .    | 45 |
| Gráfico 7: Correlação da doença de base dos pacientes candidatos ao TACTH haploidêntico submetidos ao teste PRA em relação a faixa etária. | 52 |

## ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |   |
|-------|---|
| AAS   | ANEMIA APLÁSTICA SEVERA   |
| ABH   | ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HISTOCOMPATIBILIDADE   |
| APC   | CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (do inglês <i>antigen-presenting cells</i> )                            |
| BCR   | RECEPTOR DE CÉLULA B (do inglês <i>B cell receptor</i> )  |
| CEMO  | CENTRO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA   |
| CN    | CONTROLE NEGATIVO   |
| CDC   | CITOTOXICIDADE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO  |
| CP    | CONTROLE POSITIVO   |
| CTH   | CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS  |
| DECH  | DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO  |
| DLI   | INFUSÃO DE LINFÓCITOS DO DOADOR ( do inglês <i>donor lymphocyte infusion</i> )                              |
| DNA   | ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )   |
| DSA   | ANTICORPO DOADOR ESPECÍFICO (do inglês <i>specific donor antibody</i> )                                     |
| DTT   | DITIOREITOL   |
| EDTA  | ACIDO ETILENODIAMO TETRACÉTICO ( do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )                        |
| G-CSF | FATOR DE ESTIMULAÇÃO DE COLÔNICAS DE GRANULÓCITOS (do inglês <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> ) |
| HLA   | ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (do inglês <i>human leukocyte antigen</i> )                                    |
| Ig    | IMUNOGLOBULINA  |
| IgM   | IMUNOGLOBULINA M  |
| IgG   | IMUNOGLOBULINA G  |
| IL    | INTERLEUCINA  |
| INCA  | INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER  |
| IND   | INDETERMINADO   |
| LLA   | LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA   |
| LLC   | LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA   |
| LMA   | LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA   |
| LMC   | LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA   |

|        |   |
|--------|---|
| LH     | LINFOMA DE HODGKIN  |
| MFI    | INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA (do inglês <i>mean fluorescence intensity</i> )              |
| MHC    | COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> ) |
| MO     | MEDULA ÓSSEA  |
| NBG    | RAZÃO DE FUNDO NORMALIZADO  |
| PBS    | TAMPÃO FOSFATO SALINO (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )                             |
| PE     | FICOERITRINA  |
| POP    | PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO  |
| PRA    | PAINEL DE REATIVIDADE DE ANTICORPOS   |
| REDOME | REGISTRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA  |
| SA     | ANTIGENO ÚNICO (do inglês <i>single antigen</i> )   |
| SCUP   | SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO  |
| SISHLA | SISTEMA HLA   |
| SP     | SANGUE PERIFÉRICO   |
| SMD    | SINDROME MIELODISPLÁSICA  |
| TACTH  | TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS   |
| TCTH   | TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS   |
| TCR    | RECEPTOR DE CÉLULA T (do inglês <i>T cell receptor</i> )  |
| Th     | T HELPER  |
| TMO    | TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA   |

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Complexo Principal de Histocompatibilidade

A descoberta do complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex - MHC*) se deu por George Snell e colaboradores, na primeira metade do século XX. Este grupo de pesquisadores notou que existia fundamentalmente uma região cromossômica, cujos produtos sintetizados eram responsáveis pela rejeição imediata ao transplante entre linhagens de camundongos endogâmicos. Esta região foi identificada como *locus* principal de histocompatibilidade, presente no cromossomo 17 que codificava um grupo sanguíneo polimórfico chamado de H2 (Klein, 1986).

Todas as espécies de mamíferos apresentam genes homólogos ao H2 encontrados em camundongos, presentes no MHC que determinam o destino dos tecidos transplantados. Jean Dausset publicou suas observações e conclusões sobre a capacidade do soro de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinar leucócitos de outros indivíduos, dessa maneira, Dausset descobriu o primeiro antígeno humano, um dos produtos dos genes do sistema HLA, denominado de Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *human leukocyte antigen*). Suas descobertas criaram a possibilidade de combinar doadores e receptores de órgãos, reduzindo drasticamente o risco de rejeição após o transplante (Porto *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

Decorridos quase duas décadas após a descoberta do HLA, ainda não se conhecia outra função para esta região além da rejeição ao transplante, por este motivo, foi inicialmente denominado de “Antígeno de transplantação”. Este fato mostrava-se curioso para os estudiosos da área, uma vez que não fazia sentido uma região preservada evolutivamente para esta finalidade, visto que o transplante não se trata de um fenômeno natural (Porto *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

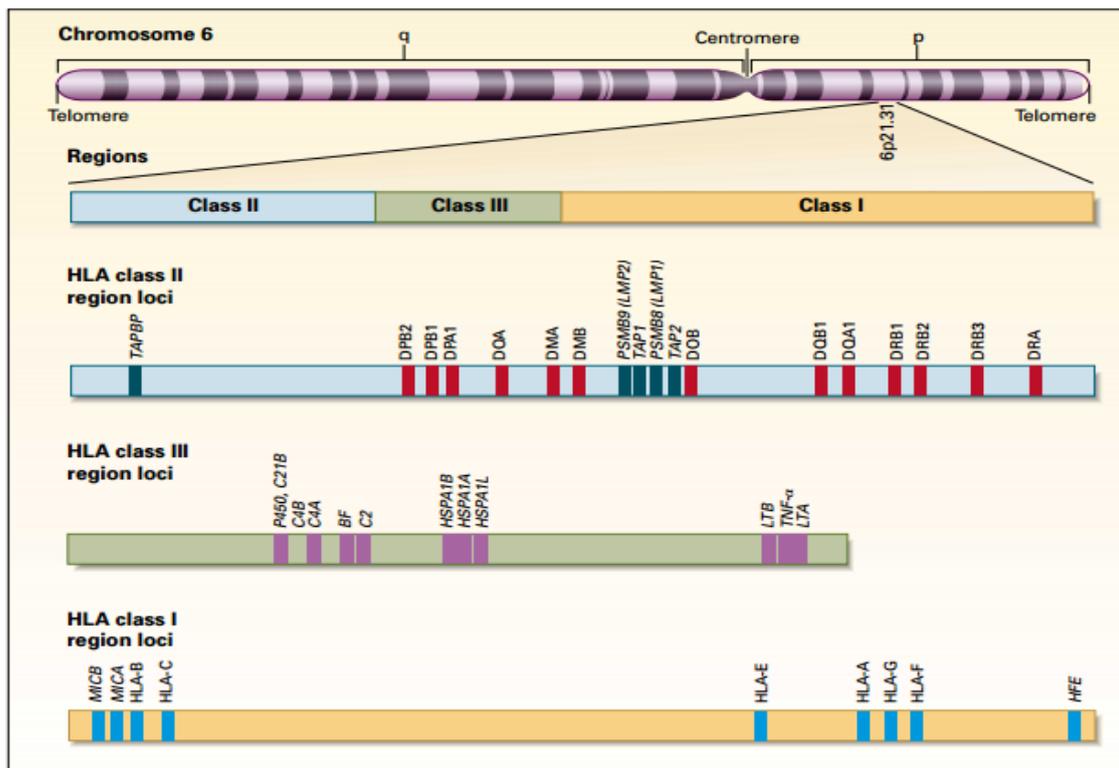
As descobertas a respeito das funções desempenhadas pelo sistema HLA foram ocorrendo gradativamente. Na segunda metade do século XX foram encontradas funções adicionais aos genes do MHC e esclarecida sua importância para todas as respostas imunológicas a antígenos proteicos. Estudos posteriores mostraram a sua associação com diversas doenças, entretanto o mecanismo

biológico que conferia ao HLA a capacidade de estabelecer o sucesso ou a perda de um transplante só foi compreendido anos mais tarde, passando a ser considerada a principal função biológica deste sistema. Várias associações foram estabelecidas com relação à influência do HLA na suscetibilidade ou resistência às diversas doenças, porém existem ainda várias questões obscuras que necessitam ser melhor elucidadas (Porto *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

Os antígenos do sistema HLA são glicoproteínas altamente polimórficas, codificadas no gene MHC, mais especificamente no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3, ocupando aproximadamente 4Mb, o que corresponde a 0,13% do genoma humano (Shiina *et al.*, 2009).

Cerca de 250 genes descritos no MHC têm papel fundamental no sistema imunológico, participando tanto da resposta imune adaptativa no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T e inflamação quanto na resposta imune inata por meio da interação com as células *Natural Killer* (Shiina *et al.*, 2009).

Os genes do sistema HLA são os mais polimórficos do genoma humano e são expressos de forma mendeliana codominante. A frequência dos alelos HLA varia entre grupos étnicos e raciais (Abbas *et al.*, 2008). São agrupados fisicamente em três regiões bem definidas e vizinhas no cromossomo 6 chamadas de: HLA Classe I, II, III (Abbas *et al.*, 2008). O mapa do MHC humano pode ser visualizado na figura 1.



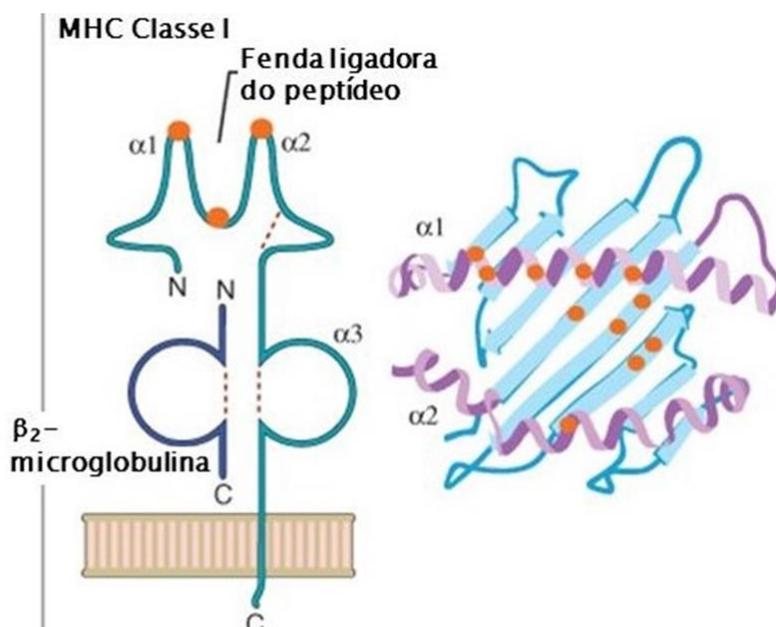
**Figura 1:** Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Nesta figura está representado o MHC, localizado no braço curto do cromossomo 6. Na porção mais telomérica encontra-se a molécula HLA classe I, onde estão localizados os Loci HLA clássicos (HLA- A, -B, -C). Na região mais centromérica encontra-se a região de classe II, contendo genes que codificam as cadeias alfa e beta dos loci de HLA classe II (HLA-DP, -DQ E -DR). A região de classe III encontra-se localizada entre as regiões de classe I e II e contém um grupo de genes, cujo suas proteínas estão envolvidas com o sistema complemento, citocinas, choque térmico entre outras funções. Adaptado Klein Sato, 2010.

Os genes HLA clássicos são expressos de maneira codominante, ou seja, cada indivíduo carrega um par de cromossomos (herdado dos genitores) que será expresso na superfície das células concomitantemente através de duas moléculas (paterna e materna). Desta forma, baseando-se no princípio de segregação independente, 50% dos irmãos são considerados haploidênticos (compartilham apenas um haplótipo), 25% são HLA idênticos (compartilham os mesmos haplótipos) e 25% são HLA diferentes (não compartilham nenhum haplótipo) (Yewdell *et al.*, 2003; Mester *et al.*, 2011).

### 1.1.1 Estruturas das moléculas HLA

#### HLA de classe I

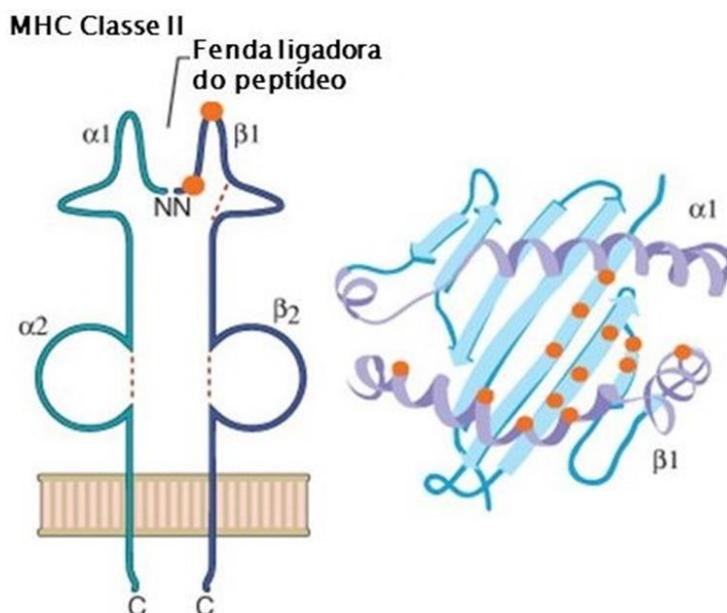
As moléculas HLA de classe I são codificadas pelos genes localizados nos *Loci* HLA-A, B, C e constituem duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente: uma cadeia  $\alpha$  (pesada), codificada pelo cromossomo 6 e uma cadeia  $\beta_2$ -microglobulina codificada pelo cromossomo 15. Os domínios da cadeia ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) das moléculas de classe I formam a fenda de ligação de peptídeos antigênicos. O domínio  $\alpha_3$  possui a mesma sequência de aminoácidos em todas as moléculas de classe I e serve como sítio de ligação para molécula CD8 do linfócito T. Igualmente ao domínio  $\alpha_3$ , a cadeia  $\beta_2$ -microglobulina é estruturalmente constante em todas as moléculas da classe I, como podemos observar na figura 2 (Horton et al., 2004). Estas moléculas estão presentes na superfície de todas as células nucleadas.



**Figura 2:** Estrutura molecular do MHC classe I. Fonte: ABBAS, 2012. As moléculas de classe I são compostas de uma cadeia  $\alpha$  polimórfica ligada de forma não covalente à  $\beta_2$ -microglobulina não polimórfica. A cadeia  $\alpha$  possui 3 domínios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) dos quais dois deles ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) devido a sua simetria, forma uma fenda de reconhecimento de peptídeos.

## HLA classe II

As moléculas do MHC de Classe II são codificadas pelos genes localizados nos *Loci* HLA –DR, DQ, DP e são compostos de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente:  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas codificadas pelo cromossomo 6. Os domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  interagem para formar a fenda de ligação de antígenos (Horton et al, 2004). A molécula de classe II está exemplificada na figura 3.

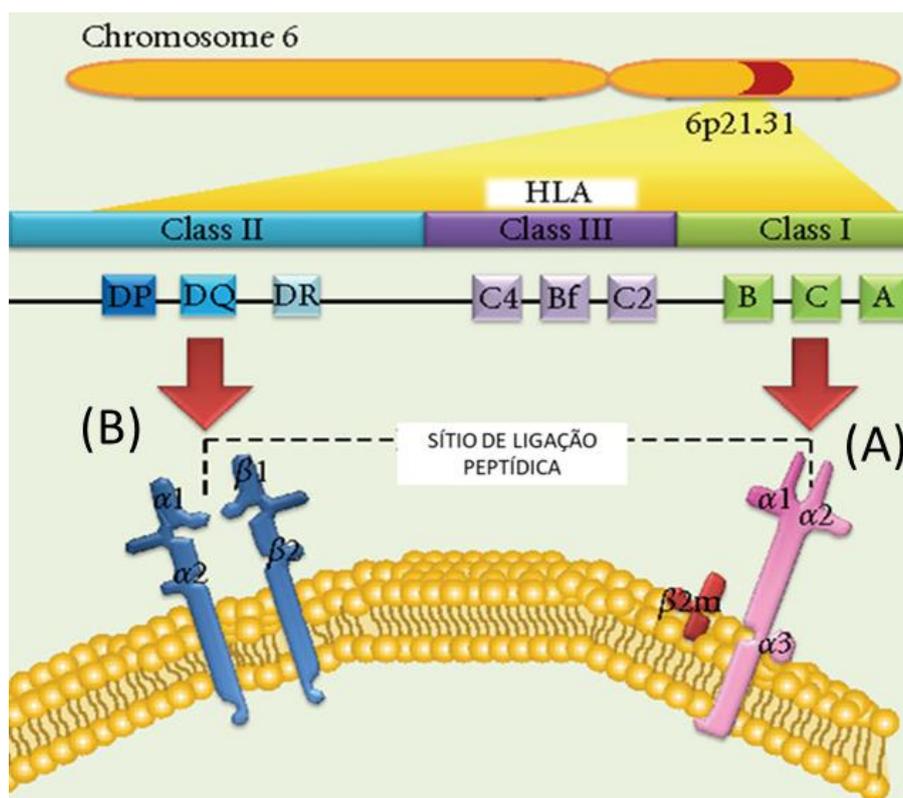


**Figura 3:** Estrutura molecular do MHC classe II. Fonte: ABBAS, 2012. As moléculas de classe II são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$  ambas codificadas no cromossomo 6. O sítio de ligação de peptídeos nesta molécula se dá entre as cadeias  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , resultando em uma maior abertura no sítio de ligação a antígenos, acomodando assim peptídeos maiores do que 12 aminoácidos.

As moléculas HLA de classe II têm uma distribuição celular mais restrita, sendo encontradas, constitutivamente, em linfócitos B, macrófagos/monócitos, células dendríticas, células de Langerhans da pele e em algumas células hematopoiéticas precursoras. A expressão das moléculas classe II também pode ser induzida em linfócitos T ativados em outras células incluindo fibroblastos e células endoteliais (Abbas *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Funções das moléculas HLA

Sabe-se que a função básica das moléculas HLA é promover o reconhecimento dos peptídeos pelos linfócitos T CD8+ e T CD4+ cujas funções efetoras são distintas. Esse reconhecimento pode ocorrer por duas vias : a via citosólica e a via endolítica (Marsh *et al.*, 2000c; d). Na via citosólica, a molécula HLA de classe I associa-se ao peptídeo endógeno medindo de 8-10 resíduos de aminoácidos, ligados na fenda formada entre os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (Marsh *et al.*, 2000a; Gatti e Pierre, 2003) (Figura 4-A). Esses peptídeos serão reconhecidos pelos linfócitos T CD8+ que tem função citotóxica capaz de matar as células infectadas por vírus ou por outros patógenos intracelulares ou células tumorais (Horton *et al.*, 2004).



**Figura 4:**Localização do MHC no cromossomo 6. Os genes HLA estão agrupados por classes (Classe I e II) de acordo com a estrutura, expressão e função dos antígenos. A Região III não é uma região HLA codificando, contudo, proteínas que intervêm na resposta imunológica. (A) representação estrutural da molécula HLA classe I (B) representação estrutural da molécula HLA classe II. Adaptado de: (Ayala Garcia *et al.*, 2012)

Na via endolítica, o antígeno exógeno, fagocitado pela célula apresentadora de antígeno é digerido por enzimas proteolíticas, origina diversos peptídeos medindo de 12-24 resíduos de aminoácidos que se ligam na fenda da molécula HLA classe II (Marsh *et al.*, 2000b; Gatti e Pierre, 2003) (Figura 4-B). O complexo formado migra para a superfície da célula onde é reconhecido pelos linfócitos T CD4+ que possuem uma ampla gama de funções efetoras, todas envolvendo a produção de citocinas que agem sobre outras células do sistema imune. Em geral, os antígenos apresentados pelas moléculas HLA de classe II são derivados de patógenos presentes no espaço extracelular (Horton *et al.*, 2004).

A relação do sistema HLA com o transplante alogeneico de células tronco hematopoiéticas (TACTH) é de extrema importância para garantir o sucesso do transplante. Sabe-se que os genes HLA classe I e II desempenham um papel fundamental na resposta imune adaptativa e que para garantir a eficiência do transplante é necessário que o sistema imunológico do receptor tolere as células do doador, assim como o sistema imunológico do doador tolere os tecidos do receptor. (Zago *et al.*, 2001 ; Nedelec *et al.*, 2016)

A tipificação HLA e o nível do grau da compatibilidade do par receptor/doador torna-se decisivo para um melhor prognóstico dos pacientes submetidos ao TACTH. Para os transplantes haploidenticos além da tipificação HLA, a pesquisa de anticorpos anti-HLA é um diagnóstico decisivo na escolha do melhor doador. (Zago *et al.*, 2001 ; Nedelec *et al.*, 2016)

## **1.2 Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas**

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade de tratamento que consiste na infusão de células precursoras hematopoiéticas indiferenciadas (células-tronco) capazes de reconstituir a medula óssea previamente condicionada pela quimioterapia e/ou radioterapia e, posteriormente, normalizar a produção dos elementos do sangue (Leger e Nevill, 2004). Esta terapia é utilizada, principalmente, para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas, como as leucemias, anemia aplásica, imunodeficiência entre outras. As principais doenças indicadas para o TCTH encontram-se na Tabela 1. (Kerbaui e Ribeiro, 2010)

**Tabela 1:** Principais doenças hematológicas neoplásicas e não neoplásicas indicadas ao transplante de células-tronco hematopoéticas.

| DOENÇAS NEOPLÁSICAS            | OUTRAS DOENÇAS                     |
|--------------------------------|------------------------------------|
| LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA -LMA   | ANEMIA APLÁSICA-AAS                |
| LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA-LLA    | HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA |
| LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA-LLC  | ANEMIA DE FALCONI                  |
| LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA-LMC  | ANEMIA DE BLACKFAN-DIAMOND         |
| DOENÇAS MIELOABLATIVAS         | ANEMIA FALCIFORME                  |
| LINFOMAS DE HODGKIN - LH       | TALASSEMIA MAIOR                   |
| LINFOMAS NÃO HODGKIN           | IMUNODEFICIÊNCIA GRAVE COMBINADA   |
| SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS-SMD | SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH        |
| MIELOMA MÚLTIPLO               | ERROS INATOS DO METABOLISMO        |

Adaptado (Kerbauy e Ribeiro, 2010)

De acordo com o tipo de doador de células-tronco hematopoéticas (CTH), o transplante pode receber três denominações: transplante autólogo - quando as CTHs infundidas provêm do próprio paciente; transplante alogênico, neste caso as células são provenientes de outra pessoa que não o próprio receptor, estas células podem ser obtidas de um doador familiar ou não; o transplante chamado singênico, neste caso o doador é um irmão gêmeo univitelino do receptor (Leger e Nevill, 2004; Kerbauy e Ribeiro, 2010).

Além dos tipos de transplante é necessário a escolha das fontes de CTHs a serem infundidas no paciente. Elas podem ser encontradas na medula óssea (MO); sangue periférico mobilizado (SPM) e sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP). A Tabela 2 resume os tipos de TCTH e as fontes de células utilizadas.

**Tabela 2:** Modalidades de transplante de Células tronco Hematopoéticas.

| TIPOS DE TRANSPLANTE | DOADOR  | FONTES DE CTH |
|----------------------|---|---------------|
| SINGÊNICO            | IRMÃO GÊMEO IDÊNTICO                            | MO, SPM       |
| AUTÓLOGO             | PRÓPRIO PACIENTE                                | MO, SPM       |
| ALOGÊNICO            | RELACIONADO: IRMÃO/ FAMILIAR<br>NÃO RELACIONADO | MO, SPM, SCUP |

MO: medula óssea; SPM: sangue periférico mobilizado; SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

### 1.2.1 Transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas

As melhores taxas de sobrevida global e livre de progressão em transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas ocorre quando utiliza-se o doador HLA aparentado totalmente compatível com o receptor. (Symons e Fuchs, 2008) Porém, infelizmente, apenas 25% a 30% dos candidatos a esse tipo de transplante apresentam um doador aparentado HLA compatível (Szydlo *et al.*, 1997). Desta forma, surgem como opções terapêuticas a utilização de fontes alternativas como: as células de doadores não aparentados cadastrados nos Registros de doadores voluntários de medula óssea - que podem ser Nacionais (Registro de doadores de medula óssea - REDOME) e Internacionais, as células provenientes de cordão umbilical e placentário ou aquelas de doadores aparentados parcialmente idênticas.

As CTHs provenientes de doadores não aparentados são as mais amplamente utilizadas e proporcionam resultados mais próximos ao TACTH aparentado HLA compatível. Como limitações, esses pacientes enfrentam a dificuldade de encontrar doador no Registro de medula, que varia significativamente dependendo do grupo étnico do indivíduo, podendo representar 60%-70% no grupo caucasiano ou apenas 10%-20% para os outros grupos raciais e suas miscigenações (Szydlo *et al.*, 1997). Outro fator limitante na busca de doadores não aparentados é a questão do tempo. Encontrar este doador pode levar vários meses e muitas vezes o paciente portador de doença onco-hematológica não dispõe deste período de espera devido à progressão de sua doença de base ou pela deterioração clínica que está em curso (Tiercy *et al.*, 2000; Tiercy *et al.*, 2007).

O uso do sangue de cordão umbilical e placentário é uma alternativa mais ágil neste sentido, porém possui baixo número de CTH, para o tratamento em adultos, esta celularidade muitas vezes é insuficiente principalmente para indivíduos com maior peso. No caso de neoplasias hematológicas, onde se busca o efeito enxerto versus leucemia, e que, em alguns casos, requer a reinfusão de linfócitos do doador, no caso desta fonte (SCUP) essa terapia não seria possível, uma vez que não se terá mais a disponibilidade do doador (Gluckman *et al.*, 2005).

É neste sentido que a busca de alternativas mais rápidas se impõe e a utilização de um doador familiar parcialmente compatível (haploidêntico) passa a

ser uma alternativa importante, tendo em vista que 40-50% dos pacientes não tem doadores aparentados ou não aparentados 100% HLA compatíveis. Esta modalidade de transplante aumenta cerca de 95% a chance destes pacientes encontrarem um doador (Kasamon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011 ).

### 1.2.2 TACTH HAPLOIDÊNTICO

O TACTH com incompatibilidades é realizado com doador que possui o HLA com alguns loci diferentes do paciente, podendo ter um ou mais antígenos diferentes. No caso do haploidêntico, o doador tem o haplótipo 50% compatível com o receptor. Até o início da década de 90, transplantes com alguma disparidade HLA ou transplantes haploidênticos eram, em sua maioria, sem sucesso, pela alta incidência de doença enxerto contra hospedeiro (DECH) nos casos de transplantes onde não se utilizava o protocolo de depleção dos linfócitos T, ou devido à rejeição da medula infundida nos transplantes com depleção intensa dos mesmos (Kernan *et al.*, 1987; Anasetti *et al.*, 1990). Devido a essas complicações o TACTH com doador familiar haploidêntico tornou-se controverso no passado, com taxas de falha de enxertia ao redor de 30% e níveis de doença do enxerto contra o hospedeiro em torno de 60%, levando a uma mortalidade muito elevada (Symons e Fuchs, 2008).

A partir do ano de 2000, com os resultados positivos nos Estados Unidos da América (EUA), Itália e China esta modalidade terapêutica foi vista como uma opção real, porém, como novidade, trazia consigo uma nova concepção na forma de realização deste TACTH (Lu *et al.*, 2006; Rizzieri *et al.*, 2007; Luznik *et al.*, 2008). O grupo italiano de Perugia, liderado por Aversa, utilizou o conceito descrito pelo grupo de Reisner (Reisner *et al.*, 1981) de que megadoses de células progenitoras CD34<sup>+</sup> poderiam exercer um efeito positivo minimizando a rejeição, superando a barreira imposta pelos linfócitos T do receptor (Aversa *et al.*, 1994). Para aumentar o número destas células, o doador era estimulado com um fator de crescimento como por exemplo o G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*). Esta seleção passou a ser incluída no protocolo de condicionamento assim como a irradiação corporal total e/ou o uso de imunossupressores como a fludarabina com timoglobulina e a ciclofosfamida nos dias 3 e 4 pós TACTH haploidêntico. Esta

nova versão do regime de condicionamento pré e pós transplante fez com que os índices de rejeição do enxerto diminuíssem significativamente, fazendo com que o transplante haploidêntico passasse a ser uma alternativa viável (Luznik et al., 2008).

A vantagem de encontrar um doador disponível em um curto espaço de tempo, a disponibilidade do mesmo para a terapia celular pós transplante (doação de linfócitos) e/ou a possibilidade de selecionar diversos familiares de acordo com as características clínicas somado a descoberta e aplicações de novas drogas aos protocolos de condicionamento fizeram com que o Transplante haploidêntico passasse a ser a única esperança para estes pacientes e seus familiares (Raiola et al., 2014).

Porém, vale ressaltar que esta modalidade terapêutica deve ser indicada de maneira criteriosa, pois trata-se de um transplante mais complexo, onde o grupo de pacientes indicados para este procedimento encontra-se em um estado crítico tanto clinicamente, pela evolução da doença, quanto imunologicamente, devido as inúmeras transfusões (Raiola et al., 2014).

Devido às respostas imunológicas decorrentes destas complicações fez-se necessário a realização de exames específicos do sistema HLA nestes pacientes, para detectar a presença de anticorpos formados durante o período pré e pós transplante. Estes exames são indispensáveis para realização do transplante haploidêntico, pois complementam a decisão por um melhor doador haploidêntico e auxiliam na estratégia terapêutica pré e pós transplante.

No Brasil, esta modalidade de transplantes tem sido realizada em hospitais como o Instituto Nacional de Câncer (INCA) onde existe o programa de TCTH já bem estruturado, com protocolos definidos de acordo do Sistema único de Saúde (SUS) e com indicações bem estabelecidas, porém faz-se necessário, para os transplantes haploidênticos, a implementação de técnicas laboratoriais específicas para auxiliar na melhor de seleção de um doador.

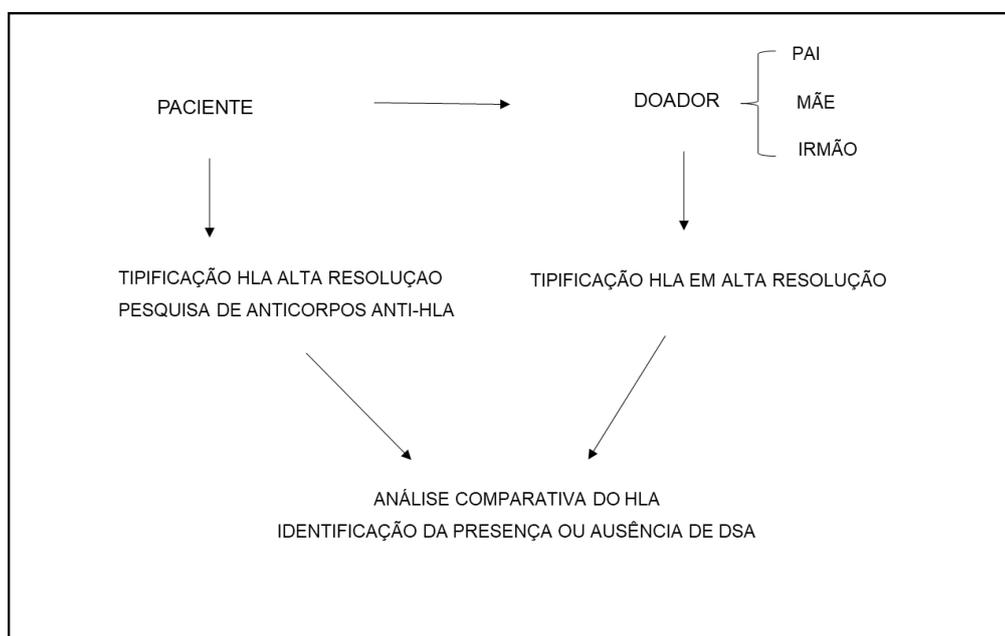
A pesquisa de anticorpos anti-HLA é primordial para a tomada de decisão da equipe médica quanto a viabilização do transplante e até mesmo os protocolos utilizados pós transplante. A presença destes anticorpos específicos contra o

doador está relacionada diretamente com a rejeição e as complicações pós-transplantes (Mendes *et al.*, 2010).

### 1.3 Etapas do TACTH

A primeira etapa de um transplante consiste na avaliação da compatibilidade HLA entre o doador e o receptor (Figura 5). A seleção do doador com grau adequado de compatibilidade representa uma das estratégias essenciais para o sucesso do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Mendes *et al.*, 2010).

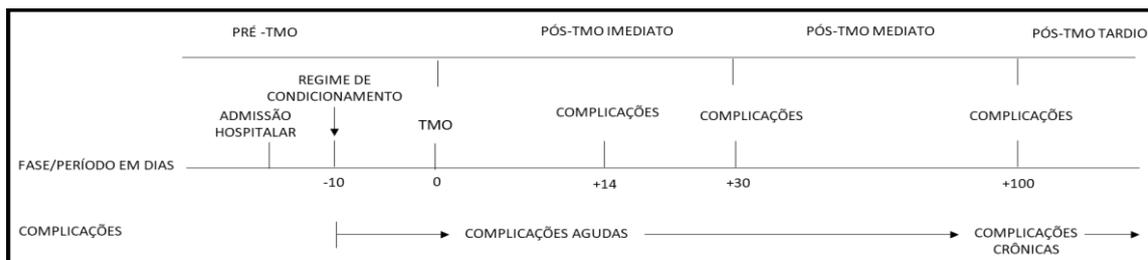
No caso dos Transplantes Haploidênticos além da tipificação HLA por biologia molecular do doador e do paciente é necessário a realização de exames sorológicos específicos como a pesquisa de anticorpos anti-HLA (PRA); presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA), visto que é um transplante com 50% de incompatibilidade HLA entre o par receptor/doador (Figura 5)



**Figura 5:** Etapas realizadas no processo de decisão do tipo de Transplante. Para os TACTH é realizado a tipificação HLA de alta resolução dos pacientes e dos doadores familiares. Nos transplantes haploidêntico além da tipificação molecular é realizado no receptor o teste PRA, para detecção de anticorpos anti-HLA. Após esses resultados é feito uma análise multiparamétrica das compatibilidades HLA e a detecção de anticorpos específicos do doador (DSA).

A segunda fase refere-se ao regime de condicionamento, definido como a associação de drogas quimioterápicas como bussulfano, ciclosporina, citarabina entre outras, com o objetivo de erradicar as células tumorais e de promover imunossupressão, para evitar a rejeição, precedendo a infusão das células-tronco. O condicionamento pode ser mieloablativo ou de intensidade reduzida, dependendo da doença de base do paciente. No primeiro regime de condicionamento são utilizadas altas doses de quimioterápicos para destruição da doença e da medula óssea do paciente, com alto risco de toxicidade e de morte. No condicionamento de intensidade reduzida, também chamado de não mieloablativo, tem-se o objetivo de diminuir a toxicidade e a mortalidade associada ao transplante. Além disso, este último possibilita a realização do TCTH em pacientes com mais de 60 anos ou com comorbidades (Saboya *et al.*, 2010).

Após o regime de condicionamento o paciente recebe, via infusão intravenosa, as células-tronco hematopoéticas (CTH) previamente coletadas de um doador, caracterizando a terceira fase. Estas células migram para o microambiente medular, fenômeno conhecido como *homing*, e então o processo de reconstituição hematopoiética tem início. Durante todo o período compreendido entre o dia do TCTH (D0) e o início da recuperação hematopoiética o paciente encontra-se com aplasia medular, imunossuprimido e susceptível a infecções virais, fúngicas, bacterianas e outras, correspondendo assim a quarta fase do processo – as complicações pós transplante. Clinicamente, a “pega medular” é observada após três dias consecutivos de contagem constante de neutrófilos, o que ocorre por volta do vigésimo primeiro dia após transplante (D+21) (Voltarelli *et al.*, 2009). Nos transplantes haploidênticos é adicionado a ciclofosfamida nos dias três (D+3) e quatro (D+4) pós transplante. A figura 6, representa todo o processo o qual o paciente é submetido quando indicado ao TACTH. Na Figura 6 está representado todo processo citado acima de forma esquemática, desde a internação até 100 dias após o transplante.



**Figura 6:** Representação esquemática do processo de TACTH. O paciente é admitido no centro transplantador 10 dias antes do transplante, para o regime de condicionamento. No dia 0 o transplante é realizado, e após este dia inicia-se o monitoramento da enxertia hematológica. Podendo ocorrer complicações agudas ou crônicas. TMO: transplante de medula óssea. Adaptado de Leger e Nevill, 2004.

#### 1.4. Imunologia dos transplantes

Sabe-se que o sistema imunológico desenvolveu elaborados e eficientes mecanismos para proteger o organismo do ataque de agentes externos. Esses mesmos mecanismos de defesa são responsáveis pela rejeição ao transplante de qualquer indivíduo que não seja geneticamente idêntico ao receptor. (Opelz *et al*, 2007)

Os aloenxertos, as CTHs do doador, estimulam respostas de células T e B semelhantes às respostas imunes a antígenos proteicos convencionais, porém com algumas particularidades. O reconhecimento do aloantígeno por células T leva a proliferação e diferenciação de linfócitos virgens em células efetoras, que migram para o enxerto e medeiam a rejeição. Paralelo ao reconhecimento dos aloantígenos, a ativação de células alorreativas é coestimulada pela presença de moléculas específicas e por citocinas. O bloqueio destas citocinas, é uma importante estratégia terapêutica de imunossupressão, principalmente nos TACTH haploidêntico. (Abbas *et al*, 2008; Horton *et al*, 2004)

##### 1.4.1 Reconhecimentos de Antígenos

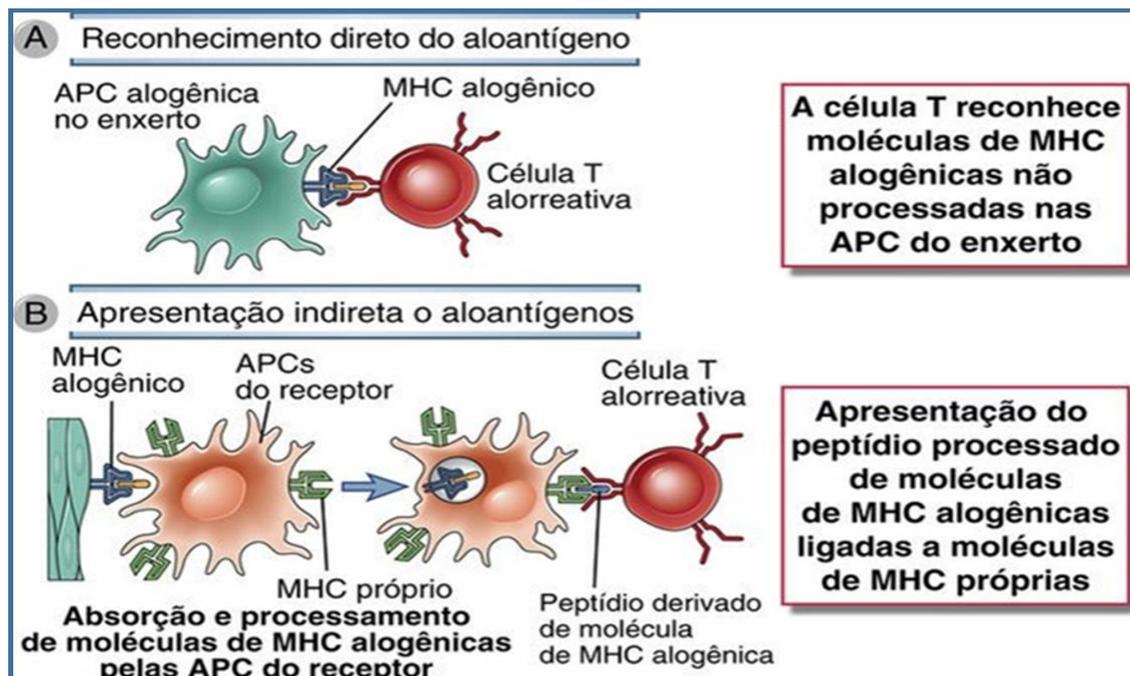
O reconhecimento de aloantígenos pelo sistema imune é realizado pelo receptor -TCR (do Inglês *T cell receptor*) presente na superfície da célula T, que os reconhecem apenas quando estão apresentados na superfície de outras células, que atuam como células apresentadoras de antígenos-APCs (do inglês: *antigen*

*presenting cells*) (Sayegh *et al.*, 1994). As APCs podem ser tanto células do doador como do receptor.

No primeiro caso, as células estão presentes no enxerto, expressando tanto antígenos de classe I, quanto classe II e com capacidade de estimular, diretamente, as células T do receptor caracterizando a via direta do alo-reconhecimento (Figura 7-A). Estudos apontam que até 2% das células T de um indivíduo são capazes de reconhecer e responder diretamente a uma única molécula do MHC estranha, e esta alta frequência de célula T reativas contra moléculas do MHC alogênicas é uma das razões pelas quais aloenxertos desencadeiam fortes respostas imunológicas *in vivo*. (Larsen *et al.*, 1990)

Na outra forma de reconhecimento, as células apresentadoras de antígenos do receptor fagocitam os aloantígenos do enxerto, expressando os epítopos processados nas fendas da superfície celular, caracterizando a via indireta do alo-reconhecimento. (Larsen *et al.*, 1990) (Figura 7-B).

Nos transplantes a ativação de células B alorreativas ocorre sob os mesmos sistemas de apresentação indireta de antígeno. Os mecanismos efetores responsáveis pela rejeição de aloenxertos pelo sistema imunológico são mediados, juntamente com as citocinas inflamatórias, por três células: as células T alorreativas CD4+(MHC II) que levam a produção de citocinas inflamatórias, ou seja, resultam em processo inflamatório semelhante a DECH; células T alorreativas CD8+(MHC I) que levam a ativação do linfócito T citotóxico (matam células nucleadas do enxerto) e a produção de citocinas inflamatórias; e células B alorreativas que produzem os aloanticorpos (Larsen *et al.*, 1990 ; Moura *et al.*, 2009).

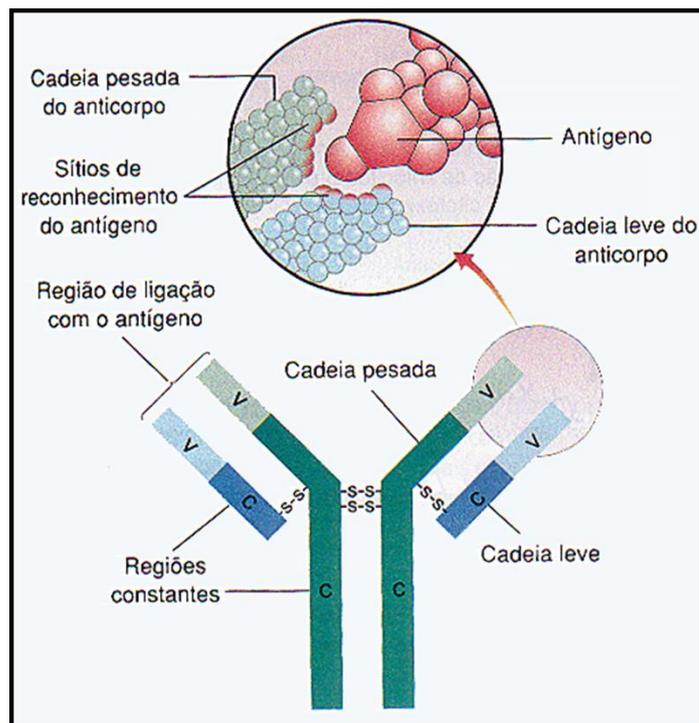


**Figura 7:** (A) Na alorreatividade direta as células do doador são reconhecidas pelas células T do receptor. (B) Na alorreatividade indireta o MHC do doador é processado e apresentado para células T do receptor. Adaptado de Abbas *et al.*, 2008b

## 1.5. ANTICORPOS

### 1.5.1 Estrutura e Função

Anticorpo é uma molécula que reconhece um antígeno específico; esse reconhecimento é um componente vital da resposta imune adaptativa. Os anticorpos são compostos por quatro polipeptídios: duas cadeias pesadas idênticas (grandes unidades peptídicas) que estão parcialmente ligadas uma à outra por pontes de dissulfeto, na formação de “Y”, que são flanqueadas por duas cadeias leves idênticas (pequenas unidades peptídicas). Além das cadeias peptídicas os anticorpos são formados por duas áreas: uma chamada de domínio variável ou região variável onde ocorre o reconhecimento do antígeno, e outra conhecida como domínio constante ou região constante, que é a base do anticorpo ((Abbas *et al.*, 2008b). Na figura 8 está ilustrado as estruturas de um anticorpo.



**Figura 8:** Estrutura e função do anticorpo. Nesta figura está representada a região de reconhecimento do antígeno/anticorpo, região de ligação com o antígeno e as regiões constantes da molécula de anticorpo. Fonte: (Abbas *et al.*, 2008a)

Semelhante aos receptores de células T (TCRs) e aos receptores de células B –BCRs (do inglês *B cell receptor*), a diversidade de anticorpos é produzida pela mutação e recombinação de aproximadamente 300 segmentos de genes diferentes que codificam domínios variáveis de cadeia leve e pesada em células precursoras que se destinam a tornar-se células B. O número de domínios constantes repetidos em classes de Imunoglobulinas (Ig) é o mesmo para todos os anticorpos correspondentes a uma classe específica. (Patel e Terasaki, 1969; El-Awar *et al.*, 2002; Vilches e Nieto, 2015).

### 1.5.2 Formação dos Anticorpos anti-HLA

Diferentemente do que acontece com o Sistema sanguíneo ABO, por exemplo, não existem anticorpos anti-HLA ocorrendo espontaneamente. Esses anticorpos são produzidos como resultado de imunização durante transfusões, gestações e / ou transplantes prévios (Abbas, *et al.*, 2008)

Nos transplantes o papel desempenhado por esses anticorpos em resposta ao aloenxerto passa pela ativação dos linfócitos B, que é dependente do estímulo produzido por citocinas secretadas pelas células T auxiliadora tipo 2. Estas células produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), culminando na expansão e proliferação dos linfócitos B. As interleucinas secretadas por T helper tipo 2 (Th2), principalmente a IL-4 por serem fatores de crescimento de linfócitos B levam à expansão clonal de plasmócitos e à produção de anticorpos, cuja interação com aloantígenos específicos ativam a resposta inflamatória envolvendo o sistema complemento ocorrendo a lesão da membrana celular, levando à destruição do tecido, por meio da geração de proteínas formadoras de poros. Além disto, sub-produtos da ativação da cascata do sistema complemento e ativação plaquetária contribuem para a quimiotaxia e adesão de células fagocitárias que acabam despejando seu conteúdo lisossomal nas células do órgão transplantado. Anticorpos anti-HLA da classe IgG também contribuem para aumentar adesão das células fagocitárias, uma vez que estas são possuidoras de moléculas CD16, isto é, receptor para a porção Fc da IgG, sendo elas as responsáveis pelas complicações pós transplantes. (Pattison e Krensky, 1997)

O significado clínico dos anticorpos anti-HLA foi pela primeira vez documentado por Terasaki e colaboradores, que correlacionaram a presença de anticorpos pré-formados no soro do receptor com a perda do enxerto por rejeição. (Patel e Terasaki, 1969)

Em 1969, Terasaki e cols. mostraram que a realização de transplante com prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) positiva levava a falência imediata do órgão em 80% casos. Com esses estudos concluíram, então, que a prova cruzada deve ser rotineiramente realizada antes do transplante e, caso seja positiva, o procedimento não deve ser realizado com o doador em questão. Este estudo também mostrou que receptores com painel de reatividade de anticorpos (PRA) acima de 20% teriam maior probabilidade de apresentar prova cruzada positiva quando o candidato a doador era não-relacionado (doador falecido ou doador vivo não parente) no caso dos transplantes renais ((Patel e Terasaki, 1969). A partir da década de 70 houve o aperfeiçoamento da técnica para a realização da prova cruzada com a adição de dithiothreitol (DTT) para identificar

anticorpos da classe de imunoglobulina do tipo M (IgM) e uso da citometria de fluxo (Tait *et al.*, 2013). Mais recentemente iniciou-se o uso de ensaios com fase sólida para identificação precisa de anticorpos específicos (Pei *et al.*, 2003; El-Awar *et al.*, 2005).

Atualmente a avaliação imunológica pré-transplante inclui a tipificação HLA por biologia molecular e a análise do painel de reatividade de anticorpos por citometria de fluxo. Através de seus estudos, Terasaki confirmou a importância da avaliação imunológica pré-transplante e, a partir dos anos 90, dedicou-se aos estudos que relacionaram o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA pós transplante com pior desfecho do enxerto (Terasaki e Ozawa, 2004).

Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos em relação ao transplante de órgãos sólidos, principalmente o renal, ocasionando assim, um melhor conhecimento do comportamento desses anticorpos e uma padronização nas técnicas sorológicas utilizadas na escolha de um doador. Porém, nos TACTH haploidênticos sua importância só está ficando clara agora com os avanços nas tecnologias imunológica, tanto laboratorial como terapêutica (Janeway *et al.*, 2007b).

Devido a esses avanços o número de transplantes haploidênticos vem crescendo significativamente e com ele a necessidade da implementação de novas técnicas e padronizações das mesmas com a finalidade de minimizar as complicações pós transplantes, aumentando assim a sobrevida dos pacientes (Janeway *et al.*, 2007b).

## **1.6. Complicações nos Transplantes**

Nos TCTH a rejeição mais comumente observada é do enxerto contra o hospedeiro, na qual o enxerto reconhece os antígenos do paciente e desenvolve uma resposta imunológica alorreativa. Os principais antígenos reconhecidos neste processo inflamatório são os antígenos codificados pelo HLA, descritos anteriormente (Nédélec *et al.*, 2016).

Assim, se o doador e o paciente não compartilham os mesmos antígenos de HLA, as células T do doador reagirão fortemente contra os antígenos HLA não compatíveis do paciente. Nos casos em que doador e o paciente são HLA

compatíveis, mas não gêmeos idênticos, eles continuarão a ter diferenças em muitas proteínas endógenas apresentadas pelas moléculas HLA, sendo assim as células T do doador reagirão, porém de forma menos intensa, contra estes antígenos menores do paciente (Nédeléc *et al.*, 2016).

A falha de pega do enxerto é outra grave complicação após o TCTH e está associada com morbidade e mortalidade elevadas. Este processo fisiopatológico pode ser recorrente de rejeição causada por linfócitos T do paciente, células *Natural Killer* ou anticorpos anti-HLA. Ainda existe o agravante nos casos de transplantes com incompatibilidade HLA, transplantes entre paciente/doador não relacionados, pacientes sensibilizados ou ainda tratados com um condicionamento reduzido (Janeway *et al.*, 2007b).

Uma vez que se tornou claro que o reconhecimento das moléculas HLA estranhas é um determinante importante da rejeição do enxerto, bem como, da doença do enxerto contra hospedeiro consideráveis esforços vêm sendo realizados para diminuir o impacto da incompatibilidade HLA entre o receptor e doador nos TACTH haploidênticos (Janeway *et al.*, 2007a; Abbas *et al.*, 2008b). Dentre esses esforços, o desenvolvimento das técnicas de fase sólida foi um grande benefício nos testes de histocompatibilidade, promovendo aumento de sensibilidade e especificidade. Nos últimos anos, essas técnicas têm sido utilizadas para detecção de anticorpos doador específico- DSA (do inglês *specific donor antibody*), mesmo em baixos títulos, sendo possível identificar o título de cada especificidade de anticorpos. Através das informações extraídas da metodologia do Painel de reatividade de anticorpos- PRA é possível uma avaliação da necessidade e da efetividade dos protocolos de dessensibilização, um tratamento antecipado e rápido para pacientes com rejeição mediada por anticorpos, além de uma melhor escolha do tipo de imunossupressão e da melhor estratégia de vigilância após transplante (Caro-Oleas *et al.*, 2010).

### **1.7. Metodologias aplicadas para detecção de anticorpos anti-HLA através da Reatividade de Anticorpos contra painel de antígenos HLA**

A reatividade de anticorpos contra painel de antígenos HLA (PRA do inglês *antibody reactivity panel*) é um exame que avalia os níveis de aloanticorpos anti-HLA no sangue do receptor, demonstrando seu grau de sensibilização e a especificidade desses anticorpos, cujos resultados são fundamentais na conduta clínica para evitar a rejeição do enxerto (Caro-Oleas *et al.*, 2010).

Atualmente, o método mais utilizado para detecção de anticorpos anti-HLA é o utilizado através da tecnologia Luminex™, onde utiliza-se microesferas de poliestireno (*beads*) ligadas a antígenos HLA extraídos de células recombinantes. Estão comercialmente disponíveis testes contendo *beads* marcadas com HLA classe I e II (*Labscreen™ Mixed*), *beads* contendo HLA classe I ou II (*Labscreen™ PRA*) ou ainda *beads* contendo individualmente alelos HLA de interesse (*Labscreen™ Single antigen*) (Tait *et al.*, 2009). Tais ensaios são de alto custo, e por este motivo não se encontram disponíveis em todos os centros transplantadores. Uma abordagem comumente utilizada é a realização dos ensaios de triagem (*Labscreen™ Mixed*) e em caso de positividade, realizar-se posteriormente o ensaio de especificidades (*Labscreen™ Single antigen*).

Na triagem (*Labscreen™ Mixed*) devido as microesferas serem revestidas com um “pool” de antígenos HLA (classe I e II) de diversas linhagens celulares, o resultado é apenas qualitativo e inespecífico (Positivo ou Negativo) para HLA classe I e HLA classe II separadamente. Na etapa de especificidade (*Labscreen™ Single Antigen*) as microesferas são individualmente revestidas com apenas um antígeno HLA o que permite uma definição precisa da especificidade dos anticorpos anti-HLA e em qual concentração eles são encontrados no soro de um receptor (CARO-OLEANS *et al.*, 2010; HWANG *et al.*, 2012).

Sem dúvida a tecnologia Luminex™ permitiu uma melhor compreensão do papel dos anticorpos HLA na rejeição mediada por anticorpos precoce e tardia, nos transplantes de órgãos sólidos. Havendo também um consenso entre os centros transplantadores sobre os parâmetros utilizados pelo kit comercial Labscreen da empresa One Lambda para positividade destes anticorpos (Tait *et al.*, 2009). Porém nos TACTH haploidêntico ainda não existe um consenso destes parâmetros nos

centros transplantadores, além de vários estudos em andamento sobre a importância e o impacto dos anticorpos doador específico ou não no prognóstico do paciente.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Devido à falta de consenso nos parâmetros de liberação dos resultados do teste PRA entre os centros transplantadores em relação ao TACTH haploidêntico fez-se necessário a implementação e validação desta metodologia em nosso laboratório. O teste PRA para esta modalidade terapêutica é decisivo na escolha do melhor doador e na estratégia a ser utilizada pela equipe médica, uma vez que estes pacientes se encontram sensibilizados devido ao grande número de transfusões sanguíneas realizadas durante o seu tratamento. Este teste permite avaliar o grau de sensibilização e também detectar se esses anticorpos são específicos do doador.

A detecção da especificidade destes anticorpos e o conhecimento do comportamento dos mesmos na resposta imunológica pós transplante, pode evitar complicações graves e muitas vezes irreparáveis como a não pega do enxerto, a DECH com graves consequências incluindo o óbito.

Por estes motivos, não é possível a realização de transplantes haploidêntico, sem um resultado consistente e fidedigno quanto à identificação destes anticorpos.

Para atender as necessidades do corpo clínico do Centro de transplante de medula óssea ( CEMO) em relação aos pacientes e a demanda crescente desta modalidade terapêutica, fez-se necessário definir parâmetros no Kit comercial *Labscreen*<sup>TM</sup> voltados para esta modalidade terapêutica uma vez que não se tem consenso entre os parâmetros utilizados para liberação dos resultados entre os laboratórios que realizam o teste PRA utilizando este kit, dito padrão ouro atualmente.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi implementar um método de triagem dos pacientes que possa viabilizar o transplante haploidêntico no sistema de saúde pública do Brasil, utilizando o Centro de transplante de medula óssea (CEMO) do INCA como modelo.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- A. Validação do kit comercial *Labscreen*<sup>TM</sup> no Laboratório com Laboratório Referência.
- B. Validação da utilização das amostras de plasma.
- C. Validação das especificidades de ligação.
- D. Certificação de aptidão para realização do teste PRA pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade.
- E. Implementação do teste PRA na Rotina do laboratório.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

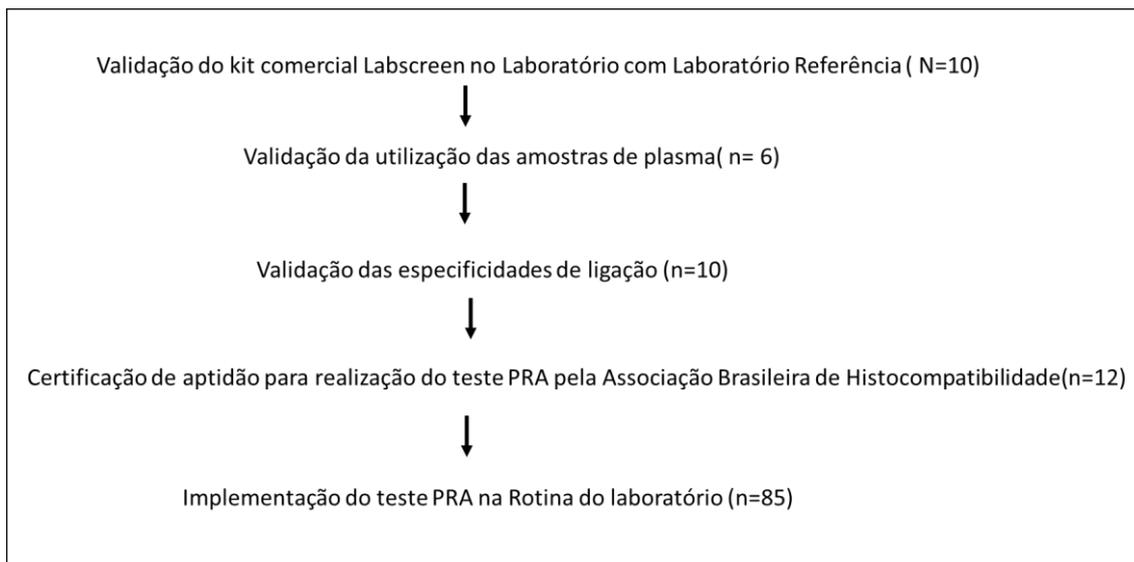
### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado utilizando a técnica de citometria de fluxo através da tecnologia Luminex, atualmente o método mais usado para detecção de anticorpos anti-HLA, por ser altamente sensível e específico, tendo a capacidade de identificar anticorpos em baixos títulos.

Para o teste PRA utilizamos os três Kits comerciais do fabricante *One Lambda: Labscreen™ Mixed* (triagem) que é composto por microesferas multicoloridas revestidas com um “pool” de antígenos HLA de classe I e II, cujo o resultado é apenas qualitativo e inespecífico para HLA classe I, HLA classe II e o kit *Labscreen™ Single Antigen* (etapa de especificidade de anticorpos) o qual é composto por microesferas revestidas com apenas um antígeno HLA, permitindo uma definição precisa da especificidade dos anticorpos anti-HLA e em qual concentração eles são encontrados no soro de um receptor. Neste trabalho foram realizadas as duas etapas do Kit *Labscreen™*, independente do resultado.

Nas duas etapas, o soro do paciente é inicialmente incubado com as microesferas, para que ocorra a reação antígeno-anticorpo. Posteriormente, é realizada marcação da reação com IgG de cabra anti-humano conjugado com Ficoeritrina (PE), seguida da aquisição dos dados no Luminex que utiliza um laser vermelho que reconhece a cor de cada microesfera e um laser verde que determina o resultado de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pela PE presente na superfície de cada microesfera. A análise dos dados foi realizada no *software HLA Fusion* (Biometrix, 2019).

Primeiramente validamos o Kit em nosso laboratório comparando os resultados obtidos com laboratório referência, conforme descrito na etapa 1. Em seguida foram realizados testes para a definição de qual amostra utilizar, soro ou plasma, ajustes no protocolo, testes de proficiência da Associação Brasileira de histocompatibilidade, implementação da metodologia com a criação do Protocolo operacional padrão (POP) e acompanhamento dos pacientes submetidos ao teste PRA. As etapas correspondentes ao estudo estão representadas na figura 9.



**Figura 9:** Etapas do processo de implementação do teste PRA. Didaticamente este trabalho foi separado em cinco etapas.

## **4.2 ETAPA1: VALIDAÇÃO DO KIT COMERCIAL *Labscreen*<sup>TM</sup> NO LABORATÓRIO COM O LABORATÓRIO REFERÊNCIA, JRM- Investigações Imunológicas.**

Foi realizada uma validação do kit *Labscreen*<sup>TM</sup> comparando o teste de PRA de 6 amostras de soro provenientes do Laboratório referência e 4 amostras de soro provenientes do CEMO/INCA. Os testes foram realizados nos dois laboratórios de acordo com o protocolo do fabricante.

### **4.2.1 Protocolos para o KIT *LABScreen*<sup>TM</sup> (ONE LAMBDA)**

Em uma placa de 96 poços, foram incubados 2,5 µl de microesferas com 10 µl de soro teste em cada poço, durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização constante. Para cada classe de HLA, foram utilizados um controle de soro negativo e positivo, que serão especificados a seguir. Todos os dados foram normatizados para cada esfera, de acordo com os resultados do controle negativo.

Após a incubação, foram adicionados 150 µl de tampão de lavagem (fornecido pelo fabricante) previamente diluído. A placa foi selada e submetida à homogeneização seguida de centrifugação a 2000xg durante 5 minutos. Depois, o

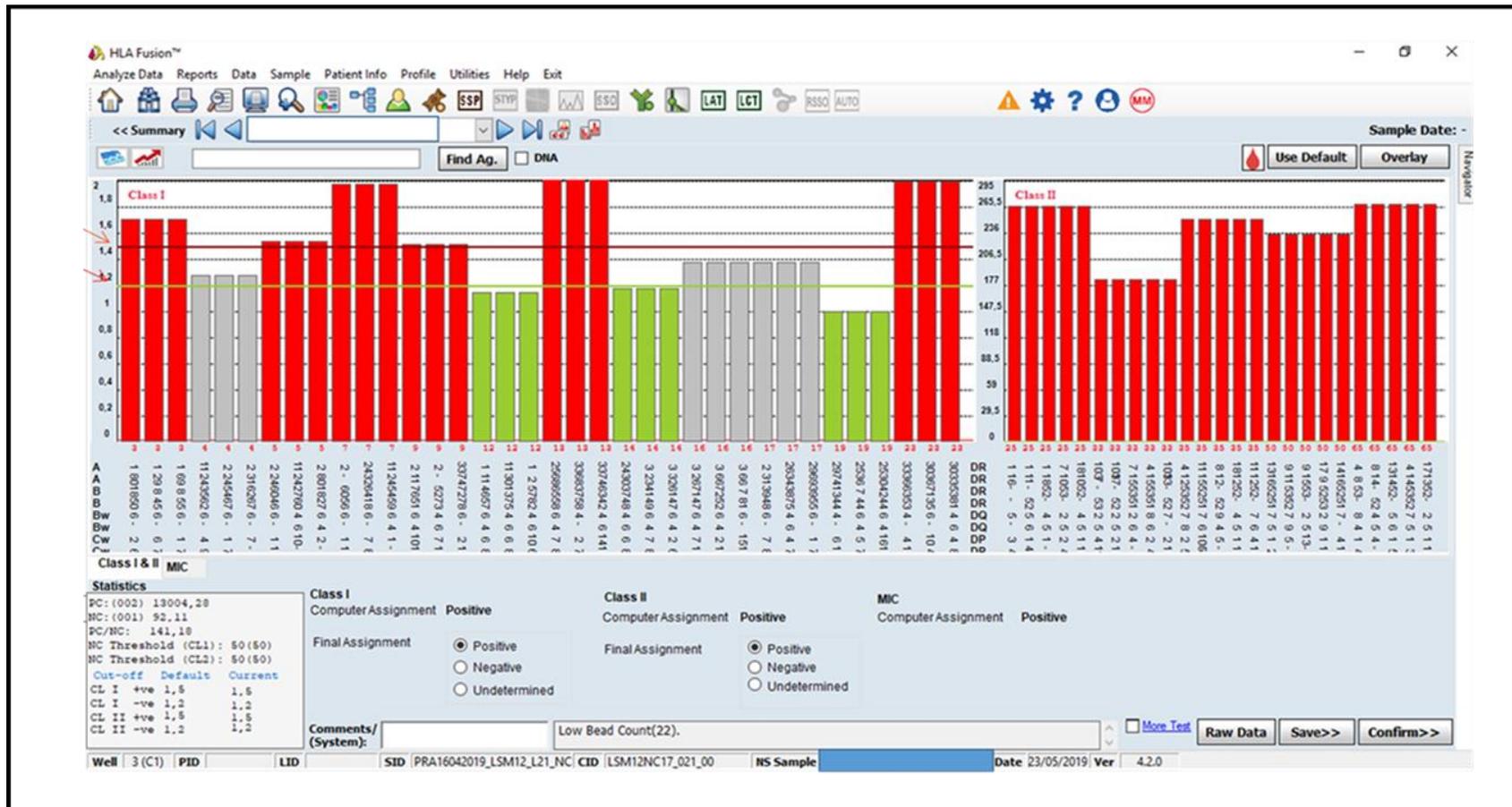
tampão de lavagem foi removido com movimento de inversão da placa e o procedimento de lavagem repetido por mais duas vezes.

Foram diluídos anticorpos IgG caprino anti-humano conjugado com PE em tampão de lavagem na diluição de 1:100 (0,5 µl de anticorpo IgG caprino humano conjugado com PE com 49,5 µl de tampão de lavagem em cada poço). Foram adicionados 50 µl dessa solução por poço seguida de homogeneização e, só então, foi iniciada a incubação durante 30 min em temperatura ambiente, ao abrigo de luz e sob homogeneização constante. Após nova lavagem, foram adicionados 65 µl de tampão fosfato- salino (PBS). A seguir, o conteúdo da placa de reação foi transferido para placa de aquisição, com fundo em U, para iniciar a leitura do teste.

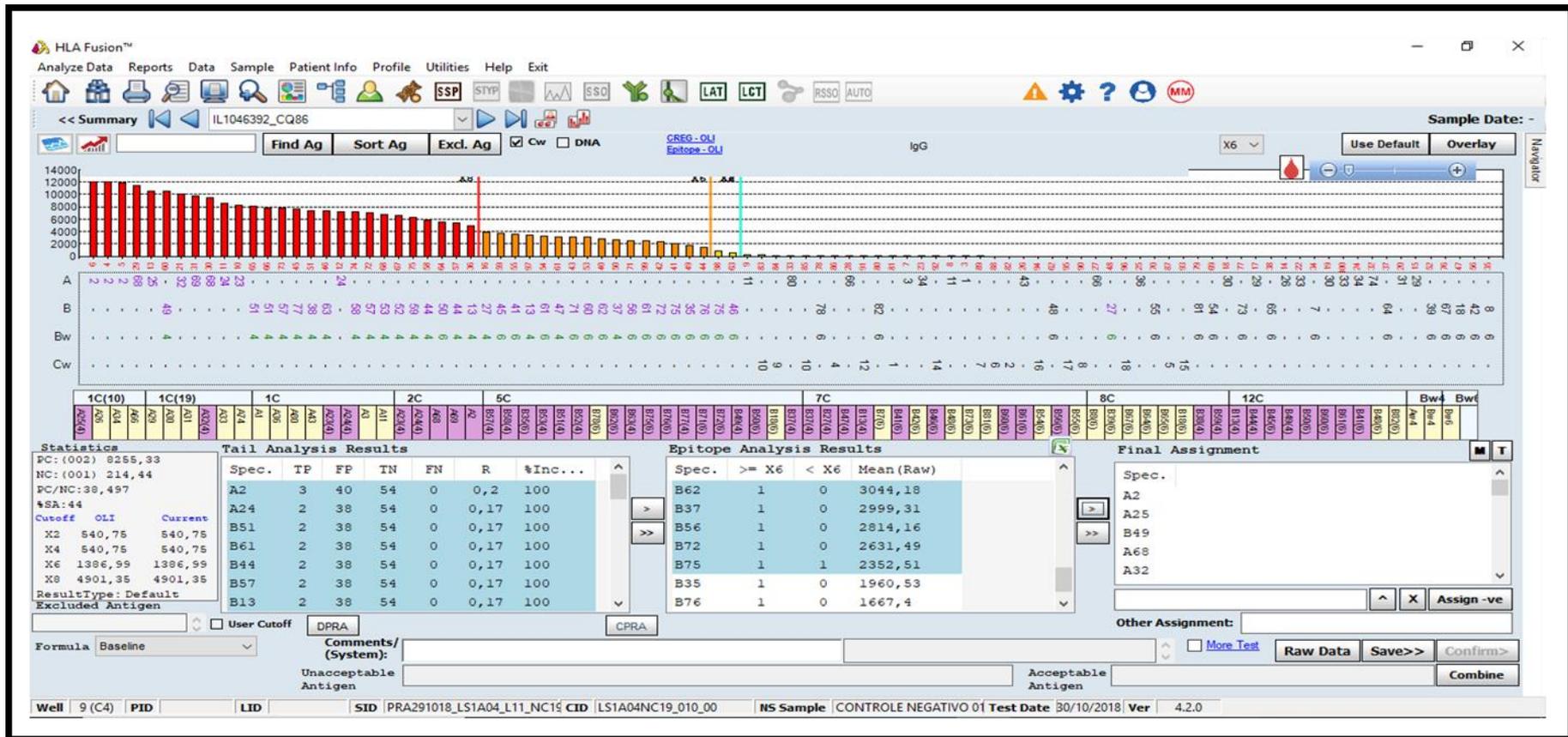
Após o procedimento técnico, a leitura foi realizada no aparelho *LabScan<sup>®</sup>100* (*Luminex Corporation*) a partir da criação de um *template* contendo as seguintes informações: catálogo correspondente do kit com o número do lote e número do lote do controle negativo. Nesta etapa foi gerado dados brutos que precisaram ser analisados pelo software específico (*HLA Fusion* - versão 4.2).

A Análise dos dados foi feita a partir do cálculo da reatividade de cada soro pelo sinal mediano fluorescente de cada microesfera revestida com o HLA. Todos os dados foram normatizados aos resultados obtidos usando um soro controle negativo (kit comercial *Labscreen<sup>™</sup> NegativeControl Serum<sup>®</sup>, One Lambda*). O cálculo realizado no teste de triagem é o valor da mediana normalizada das microesferas revestidas de HLA classe I ou classe II menos o valor mediano das microesferas do controle negativo. Nesta etapa podemos ter os seguintes resultados :Positivo, Negativo ou Indeterminado. Ele é definido de acordo com a força da reatividade anti-HLA calculado pela razão de ratio de fundo normalizado – NBG. Na figura 10, está representado um exemplo de análise desta etapa.

Para a etapa de especificidade este cálculo é realizado a partir dos valores da mediana de cada microesfera dividido pelo valor mediano de cada microesfera controle negativo. Os resultados nesta fase são analisados de acordo com a média da intensidade de Fluorescência (MFI) da reação. Em nosso laboratório considera-se positivo anticorpos anti-HLA com MFI acima de 2000. A tela de análise deste teste está representada na figura 11.



**Figura 10:** Tela de análise do Software HLA Fusion (ONE LAMBDA) com o kit *Labscreen™ mixed*. No 1º quadrante podemos observar a detecção de anticorpos nas barras vermelhas, em cinza representa a indeterminação de anticorpos e em verde resultado negativo para a presença de anticorpos no HLA classe I. No 2º quadrante está representado a positividade de anticorpos para classe II. No quadro abaixo a esquerda, identificado como “Statistics”, está representado os valores dos Controles positivos e negativos do teste.



**Figura 11:** Tela de análise do Software HLA Fusion (One Lambda) com o kit Labscreen™ Single Antigen (One Lambda). Esta tela de análise representa a especificidade dos anticorpos HLA classe I. As barras em vermelho representam os anticorpos anti-HLA positivos, as barras em laranja representam os anticorpos identificados, porém de acordo com o cutoff estabelecido, encontram-se negativos. O quadrante inferior a esquerda representa os valores de controle positivo e negativos do teste, o quadrante central está representado os anticorpos anti-HLA detectados com os valores de MFI correspondentes e no quadrante a direita estão selecionados os anticorpos anti-HLA positivos de acordo com o Cutoff estabelecido de 2000.

### 4.3 ETAPA 2: VALIDAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

O tratamento com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0.5M pH 8,0 foi realizado para evitar resultados falso- negativos decorrentes do “efeito prozona”, que ocorre quando a quantidade de anticorpos presentes no soro é desproporcional a quantidade de antígeno existente no teste. A quantidade de anticorpos é maior que a de esferas magnéticas contendo o antígeno HLA. Como em nosso laboratório as amostras chegam em tubo EDTA para a realização da tipificação HLA e no caso dos candidatos ao TACTH haploidêntico é realizado o HLA de alta resolução, resolvemos testar as amostras de plasma para o teste PRA. Para isto foi comparado os resultados encontrados nas amostras de soro tratado com EDTA e o plasma separado do tubo comercial contendo o reagente.

Seis amostras de pacientes do CEMO foram coletadas em dois tubos comerciais: um tubo com EDTA e outro tubo de soro. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000xg em seguida o sobrenadante foi retirado e colocado em microtúbulos de 1,5ml devidamente identificados com etiqueta contendo a identificação da amostra no laboratório (IL), número dado ao paciente no laboratório, nome, data, localização da amostra. O armazenamento foi feito a - 20°C.

Todas as amostras de soro foram tratadas com o EDTA antes de prosseguir para as etapas adicionais. Para isso, foram adicionados 5 µl deste reagente nas alíquotas de 95µL de soro. As amostras de plasma não foram tratadas com solução EDTA. Após o pré tratamento das amostras de soro, passamos a utilizar o mesmo protocolo tanto para soro quanto para o plasma baseado no artigo de Duijnhoven, *et al*, 2000.

Esta etapa foi realizada para a validação das amostras de plasma para o teste PRA através da tecnologia LUMINEX em nosso laboratório.

### 4.4 ETAPA 3: VALIDAÇÃO DAS ESPECIFICIDADES DE LIGAÇÃO

Foi realizado um teste comparativo com e sem o pré tratamento com o reagente *Adsorb out*. Este pré-tratamento é recomendado pelo kit *Labscreen*<sup>TM</sup> para aqueles soros/plasma que apresentam controle negativo com fluorescência de base muito elevada (alto background) de acordo com o fornecedor. O tratamento reduz ligações

inespecíficas de materiais presentes no soro/plasma humano com as beads de látex usadas na técnica de detecção de anticorpos por citometria. O protocolo utilizado foi o indicado pelo kit.

Dez alíquotas de amostras de plasma foram descongeladas e centrifugadas por 2 minutos a 10.000xg antes do início da adsorção. Foram retirados 30µl de amostra e separados em um novo microtubo, em seguida foram adicionados 3,0µl de microesferas magnéticas, previamente homogeneizadas. Após esta etapa os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos em um agitador a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados, por 5 minutos a 1.400xg. Os sobrenadantes foram reservados em um novo tubo que em seguida foram utilizados para o teste PRA.

#### **4.5 ETAPA 4: CERTIFICAÇÃO DE APTIDÃO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE PRA PELA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

Para obter a certificação de qualidade pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade - ABH foram realizados dois testes de proficiência.

As amostras do Controle de Qualidade da ABH utilizadas neste trabalho para certificação foram do teste de proficiência em que o Laboratório de HLA/INCa participou no ano de 2017 e 2018. Este teste foi realizado em duas etapas (semestral), em cada rodada foram enviados ao laboratório, três amostras de soro que foram tratadas com EDTA e *Adsorb out* e em seguida foram realizados o teste PRA para as etapas de triagem e especificidades. Os resultados obtidos neste teste são baseados no consenso entre os laboratórios participantes. Ao término das rodadas cada laboratório recebe um certificado contendo a avaliação recebida pela ABH e um certificado com o desempenho obtido.

#### **4.6 ETAPA 5: IMPLEMENTAÇÃO DA ROTINA DO TESTE PRA NA ROTINA DO LABORATÓRIO**

Durante o processo de implementação do teste PRA foram determinados critérios de aceitação das amostras que foram acrescentados no pedido do exame.

As informações contidas neste pedido foram: Nome do paciente, data de nascimento, nome dos possíveis doadores, grau de parentesco, data da coleta, data da última transfusão e se recebeu e quando recebeu imunoglobulina.

Como critérios de rejeição estabelecidas em nosso laboratório temos:

- Coleta realizada com mais de 48 horas,
- Paciente que tiver recebido imunoglobulina no prazo inferior a 24 horas (critério médico),
- Paciente que tenha recebido Plasma no prazo inferior a 15 dias.

A partir das avaliações realizadas nas etapas 2 e 3 foi criado um protocolo operacional padrão (POP) o qual foi incluído na rede INCA de Laboratórios.

Os 85 testes de PRA realizados neste trabalho seguiu o POP e foi realizado nas duas etapas do kit comercial *Labscreen*<sup>TM</sup>. O ponto de corte do MFI utilizado na etapa de especificidade foi de 2000, valores igual ou superior a este MFI foi considerado positivo. Utilizamos este ponto de corte baseado no laboratório referência (JRM) e a partir do resultado do teste de proficiência da ABH.

Para liberação dos resultados foram realizadas análises multiparamétricas. Primeiramente foi analisado a tipificação molecular de média resolução dos loci –A, -B, -C, -DRB1; -DQB1 do par doador/receptor, identificado os alelos diferentes, verificou-se a presença de anticorpo anti-HLA. Em seguida foi realizada uma análise dos epítopos e a verificação de DSA. No laudo constou as informações de PRA positivo ou negativo, se positivo a especificidade do anticorpo, presença de DSA e a tipificação HLA de alta resolução dos loci –A, -B, -C, -DRB1,-DQB1,-DPB1 por biologia molecular do doador.

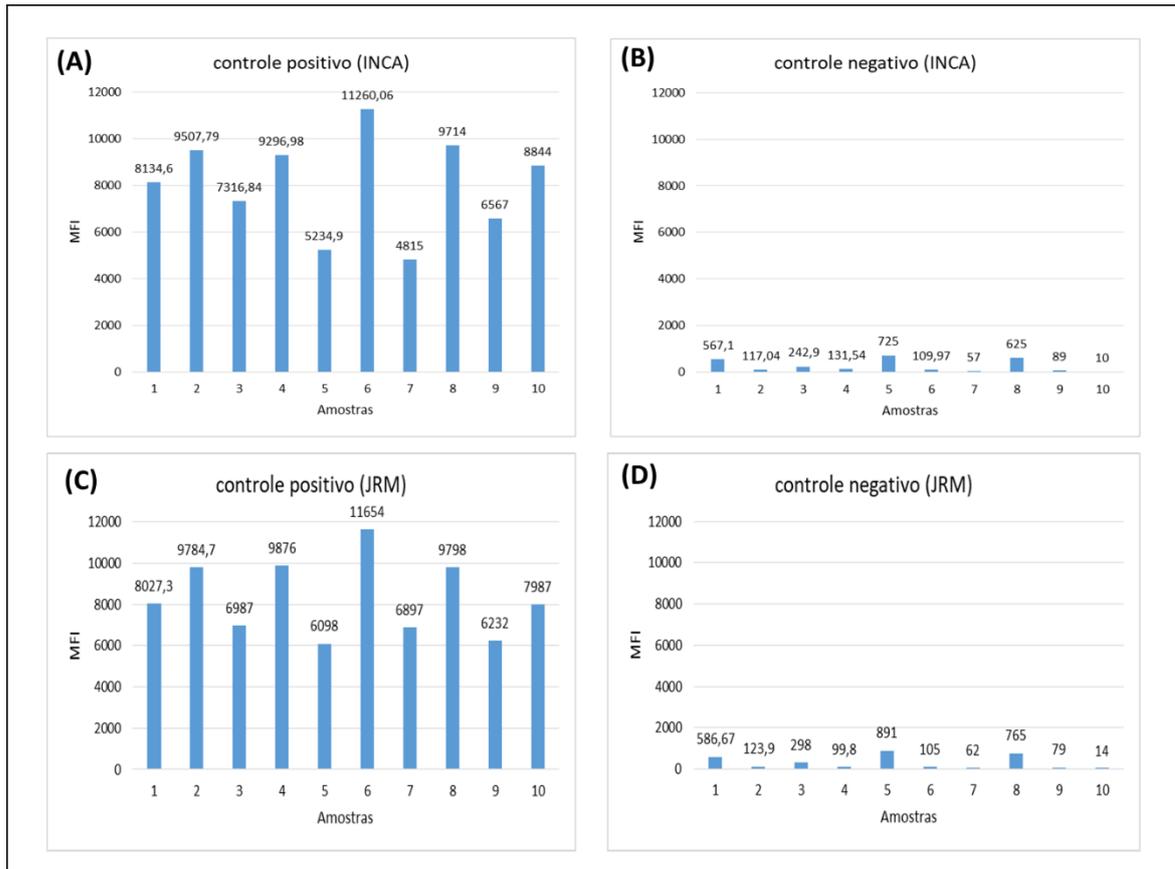
## 5. RESULTADO

### 5.1 ETAPA 1: VALIDAÇÃO DO KIT COMERCIAL *Labscreen*<sup>TM</sup> NO LABORATÓRIO COM O LABORATÓRIO REFERÊNCIA, JRM- INVESTIGAÇÕES IMUNOLÓGICAS.

Para a validação do kit *Labscreen*<sup>TM</sup> nas etapas de triagem (com o kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Mixed*) e especificidade (kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Single Antigen*) foram testadas 10 amostras de soro conforme o protocolo do fabricante. Os resultados encontrados por nós e pelo JRM (Laboratório referência) estão descritos nas figuras abaixo. Foi verificado consenso entre os testes nos parâmetros controles positivos, negativos e NBG. Os resultados obtidos tanto na etapa de triagem quanto na especificidade foram concordantes entre os laboratórios.

Na figura 12 estão representados os resultados encontrados pelo laboratório INCA e JRM correspondentes aos valores dos controles positivos (CP) e negativos (CN) no teste PRA na etapa de triagem. Foram observados que não tiveram valores divergentes entre os laboratórios, e que para os controles positivos o MFI ficou acima de 6000 na maioria das amostras estando dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante.

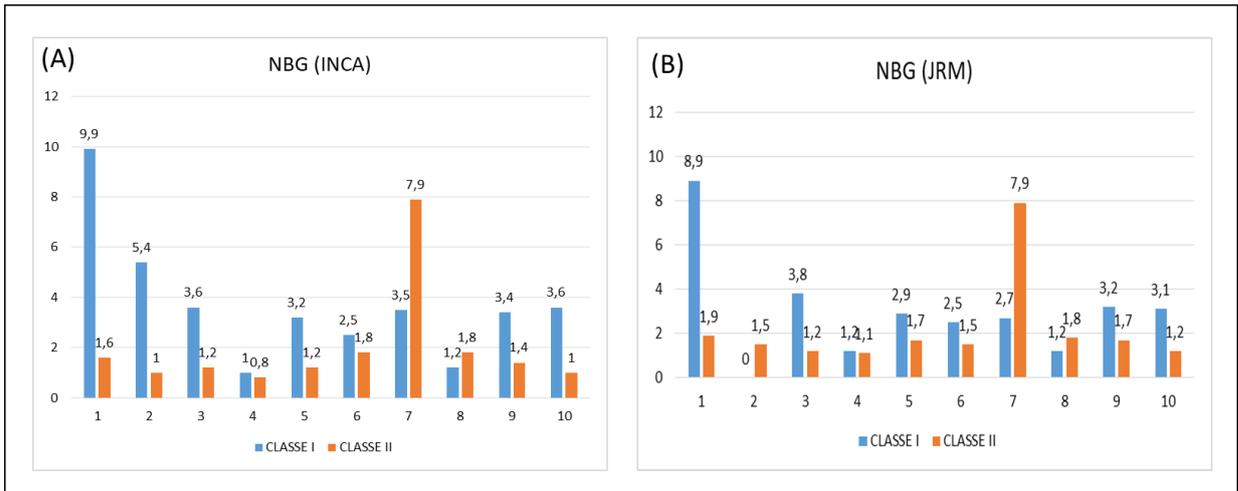
As amostras 1, 5 e 8 tiveram seus valores de controle negativo acima do estabelecido pelo fabricante (300), estas amostras foram tratadas com uma solução de bloqueio (*Adsorb out*), para diminuir o *background* e posteriormente repetidas para o teste PRA.



**Figura 12:** Comparação entre os resultados obtidos entre os laboratórios (INCA e JRM) em relação aos Controles positivos e negativos do teste PRA na etapa de triagem. Os gráficos **A** e **B** representam os controles positivos e negativos, respectivamente, das 10 amostras testadas para o ensaio de triagem do teste PRA no laboratório de Imunogenética/INCA. Enquanto os gráficos **C** e **D** representam os controles positivo e negativo do teste realizado no laboratório referência-JRM. No eixo Y estão representados os valores de MFI dos respectivos controles em cada amostra representada no eixo X.

Na figura 13 estão representados os resultados comparativos dos valores de NBG (razão de *Background* normalizado) entre os laboratórios. Estes valores foram determinados pelo *software* HLA *Fusion*, assim como a linha de corte para os resultados positivo, negativo e indeterminado.

Não foi observado diferenças significativas no valor de NBG entre os laboratórios, que pudesse resultar em resultados discrepantes.



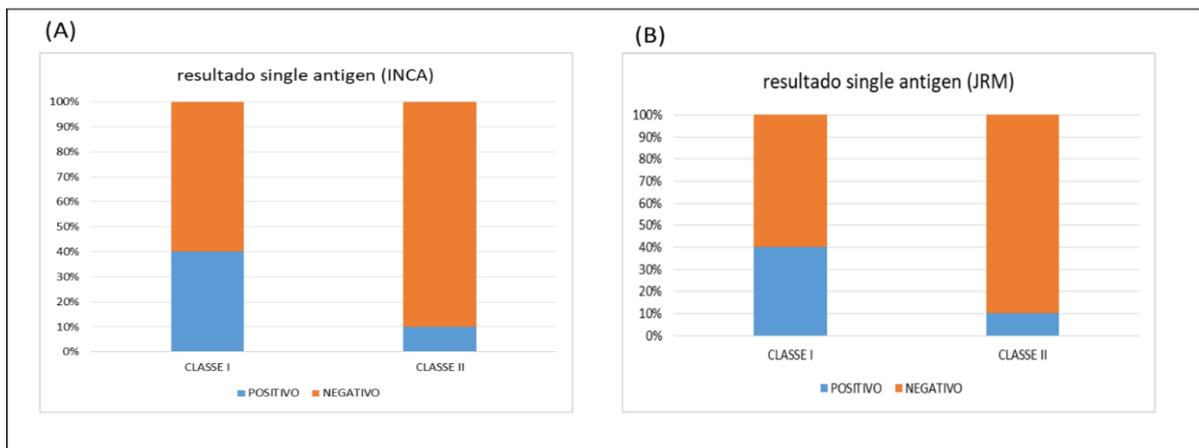
**Figura 13:** Comparação entre os resultados obtidos entre os laboratórios (INCA e JRM) em relação aos valores de NBG (razão de Background normalizado). O gráfico A representa a reatividade dos anticorpos anti-HLA calculado a partir do NBG do teste PRA realizado no Laboratório de Imunogenética/INCA. Em B está representado o resultado encontrado no Laboratório referência-JRM. No eixo Y está representado os valores de NBG encontrado em cada amostra tanto para classe I quanto para classe II, e no eixo X está representada as 10 amostras testadas.

Na figura 14, mostra o resultado final comparativo entre os laboratórios. Não houve discordância em nenhuma das amostras testadas para etapa de triagem com o kit *Labscreen™ Mixed*.

| (A) CLASSE I - Mixed |               | (B) CLASSE II - Mixed |               |               |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Amostras             | INCA          | JRM                   | INCA          | JRM           |
| amostra_01           | POSITIVO      | POSITIVO              | POSITIVO      | POSITIVO      |
| amostra_02           | POSITIVO      | POSITIVO              | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_03           | POSITIVO      | POSITIVO              | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_04           | NEGATIVO      | NEGATIVO              | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_05           | NEGATIVO      | NEGATIVO              | INDETERMINADO | INDETERMINADO |
| amostra_06           | INDETERMINADO | INDETERMINADO         | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_07           | NEGATIVO      | NEGATIVO              | POSITIVO      | POSITIVO      |
| amostra_08           | NEGATIVO      | NEGATIVO              | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_09           | INDETERMINADO | INDETERMINADO         | INDETERMINADO | INDETERMINADO |
| amostra_10           | INDETERMINADO | INDETERMINADO         | NEGATIVO      | NEGATIVO      |

**Figura 14:** Comparação entre os resultados encontrados entre os laboratórios. Na **tabela A** está representado os resultados obtidos no laboratório do INCA e JRM referentes ao HLA classe I das 10 amostras testadas e na **tabela B** os resultados referentes ao HLA classe II na etapa de triagem. Nesta figura está demonstrando o consenso existente em cada amostra testada pelo INCA e JRM.

Também foi realizado o teste PRA para a etapa de especificidade como o kit *Labscreen™ Single Antigen*, nos dois laboratórios. Após os testes foi realizada uma análise comparativa dos anticorpos detectados em ambos os laboratórios e a positividade dos mesmos em relação a linha de corte estabelecida pelo laboratório referência (MFI= 2000), a qual adotamos em nosso laboratório. Todas as especificidades de anticorpos detectados no INCA foram vistas nos testes do JRM. Os percentuais destes anticorpos estão representados na figura 15, tanto para HLA classe I como para o HLA classe II



**Figura 15:** Comparação entre os percentuais de anticorpos encontrados para o HLA classe I e II nos respectivos laboratórios. Nos gráficos A e B estão representados o percentual de anticorpos específicos encontrados para o HLA classe I e II no teste realizado no INCA e no JRM, respectivamente. No eixo Y estão representados o percentual de anticorpos anti- HLA positivos (azul) e negativos (laranja) detectados de acordo com os valores de corte estabelecidos.

| Amostras   | CLASSE I - Single Antigen |          |
|------------|---------------------------|----------|
|            | INCA                      | JRM      |
| amostra_01 | POSITIVO                  | POSITIVO |
| amostra_02 | POSITIVO                  | POSITIVO |
| amostra_03 | POSITIVO                  | POSITIVO |
| amostra_04 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |
| amostra_05 | POSITIVO                  | POSITIVO |
| amostra_06 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |
| amostra_07 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |
| amostra_08 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |
| amostra_09 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |
| amostra_10 | NEGATIVO                  | NEGATIVO |

| Amostras   | CLASSE II - Single Antigen |          |
|------------|----------------------------|----------|
|            | INCA                       | JRM      |
| amostra_01 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_02 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_03 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_04 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_05 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_06 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_07 | POSITIVO                   | POSITIVO |
| amostra_08 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_09 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_10 | NEGATIVO                   | NEGATIVO |

**Figura 16:** Comparação entre os resultados encontrados entre os laboratórios na etapa de especificidade. Na tabela A e B estão representados os resultados obtidos no laboratório do INCA e JRM referentes ao HLA classe I das 10 amostras testadas para classe I e classe II na etapa de especificidade de anticorpos anti-HLA.

Após os testes realizados entre os dois laboratórios e a verificação do consenso nas 10 amostras testadas, validamos o kit *Labscreen™ Mixed* e o *Labscreen™ Single Antigen* em nosso do laboratório. A partir desta etapa passamos a realizar o teste.

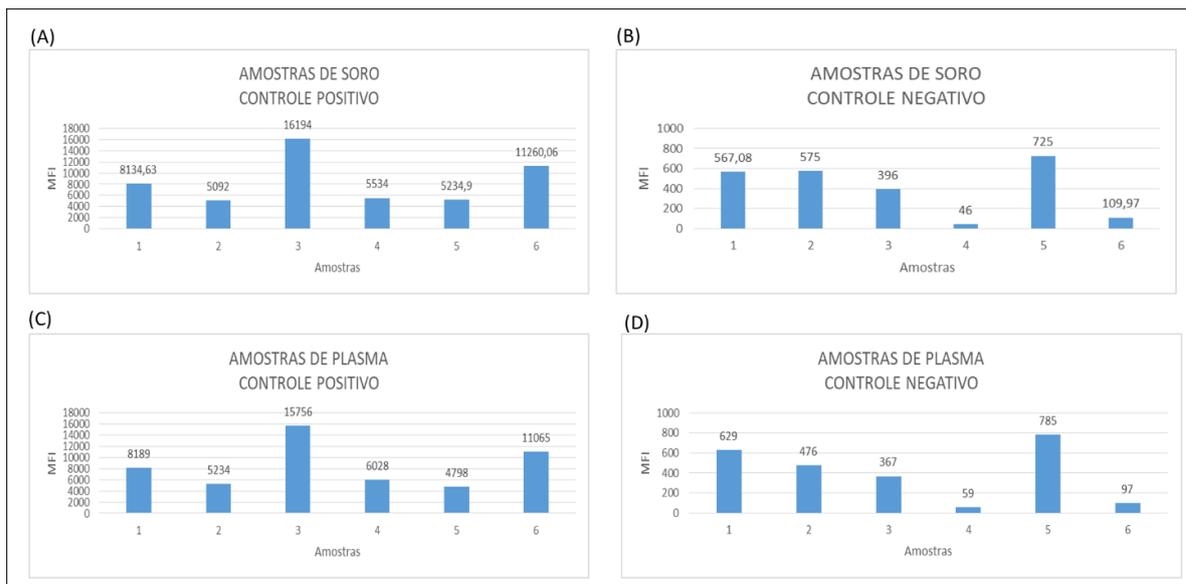
## **5.2 ETAPA 2: VALIDAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA**

Após a etapa de validação do Kit comercial *Labscreen™*, foi necessário à validação das amostras de plasma para o teste PRA. Para isto foi realizado um teste com seis pacientes do CEMO, onde foram coletadas amostras de soro e plasma. Este teste foi realizado tanto na etapa de triagem como de especificidades para excluir o efeito prozona das amostras de plasma, uma vez que todas as amostras de soro utilizadas para o teste PRA foram tratadas com EDTA.

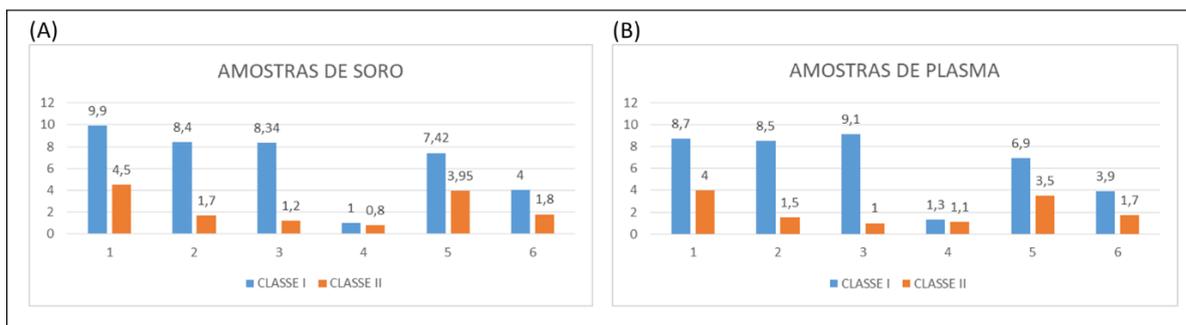
Os resultados apresentados após a comparação do teste foram concordantes em todos os parâmetros analisados como podemos observar nas figuras abaixo. Na figura 17 está demonstrado que tanto o controle positivo quanto o negativo não apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Na figura 18 está representado os valores de NBG das amostras testadas, demonstrando que não houve divergência. Os resultados finais obtidos por cada amostra na etapa de triagem podem ser comparados na figura 19.

Na figura 20, foi representado os valores de CP e CN encontrados nas amostras de soro e plasma na etapa de especificidade assim como na figura 21 foi demonstrado o resultado final destas amostras como o kit *Labscreen™ Single Antigen*. Podemos observar a partir dos resultados destas figuras 100% de consenso entre o soro e o plasma.

Diante dos resultados encontrados, foi definido que o reagente EDTA presente no tubo comercial foi suficiente para evitar os resultados falso negativos, decorrentes do efeito prozona.



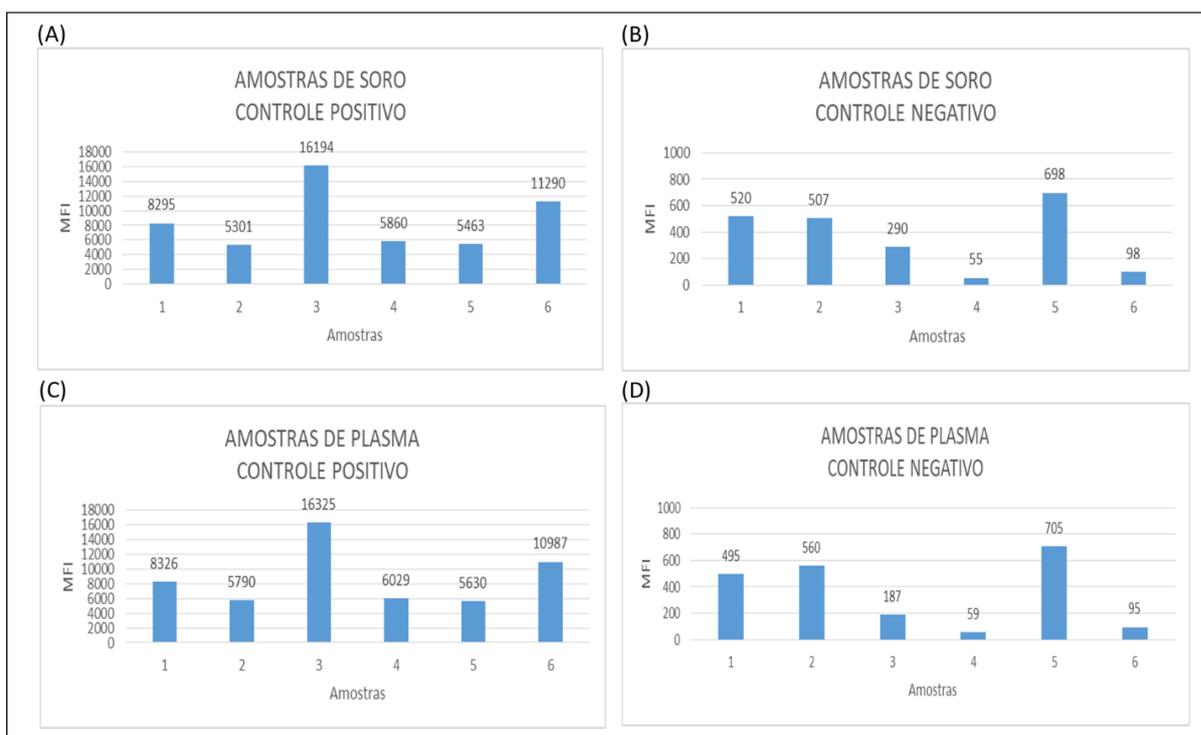
**Figura 17:** Comparação entre as amostras de soro e plasma em relação aos valores de controle positivo e negativo na etapa de triagem. Esta figura contém 4 gráficos representativos dos controles positivos e negativos das amostras de soro (gráficos A e B) e os representativos das amostras de plasma (gráficos C e D). No eixo y está representado os valores de fluorescência dos controles e no eixo x as amostras testadas.



**Figura 18:** Comparação entre os valores de NBG encontrados nas amostras de soro e plasma. Em **A** estão amostras de soro e em **B** as de plasma. No eixo y encontra-se os valores de NBG, em azul o teste de PRA para classe I e em laranja os de classe II, no eixo x são identificadas as amostras.

| (A) MIXED - CLASSE I |               |               | (B) MIXED - CLASSE II |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Amostras             | SORO          | PLASMA        | Amostras              | SORO          | PLASMA        |
| amostra_01           | POSITIVO      | POSITIVO      | amostra_01            | POSITIVO      | POSITIVO      |
| amostra_02           | POSITIVO      | POSITIVO      | amostra_02            | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_03           | POSITIVO      | POSITIVO      | amostra_03            | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_04           | NEGATIVO      | NEGATIVO      | amostra_04            | NEGATIVO      | NEGATIVO      |
| amostra_05           | POSITIVO      | POSITIVO      | amostra_05            | INDETERMINADO | INDETERMINADO |
| amostra_06           | INDETERMINADO | INDETERMINADO | amostra_06            | NEGATIVO      | NEGATIVO      |

**Figura 19:** Comparação do resultado final para HLA classe I e II encontrado nas amostras de soro e plasma. Na **tabela A** estão representados os resultados obtidos no teste PRA das amostras de soro e plasma referentes ao HLA classe I, enquanto na **tabela B** os resultados referentes ao HLA classe II na etapa de triagem utilizando o kit *Labscreen™ Mixed*.



**Figura 20:** Comparação entre os valores de controle positivo e negativo das amostras de soro e plasma na etapa de especificidade. A figura A e B estão representados os controles positivos referentes a amostra de soro, enquanto na C e D as de plasma. No eixo y está representado os valores de fluorescência dos controles e no eixo x as amostras testadas na etapa de especificidade utilizando o kit *Labscreen™ Single Antigen*.

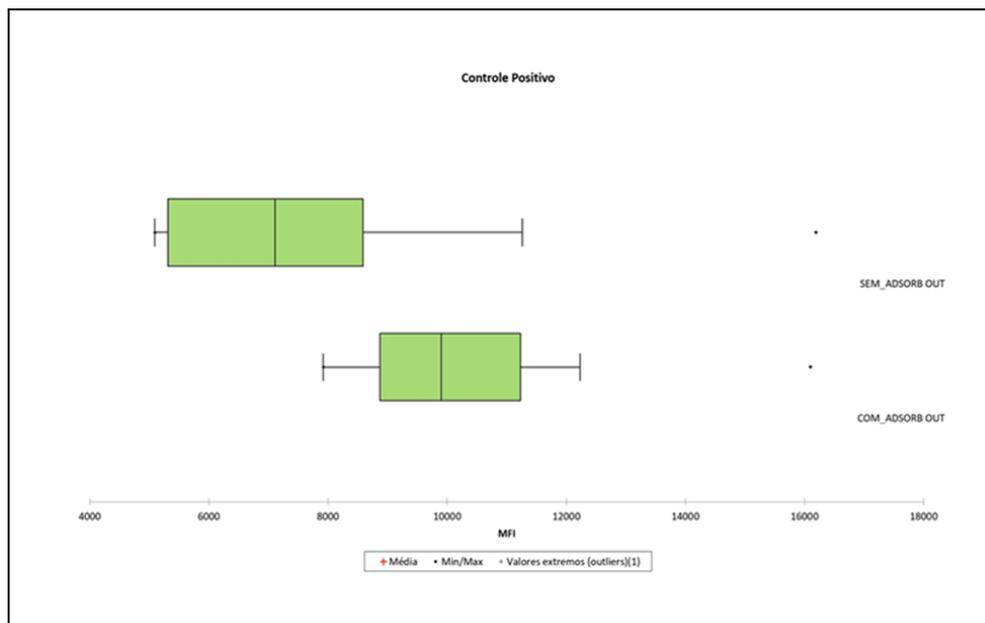
| (A)        |                           | (B)      |                            |          |
|------------|---------------------------|----------|----------------------------|----------|
| Amostras   | SINGLE ANTIGEN - CLASSE I |          | SINGLE ANTIGEN - CLASSE II |          |
| amostra_01 | POSITIVO                  | POSITIVO | POSITIVO                   | POSITIVO |
| amostra_02 | POSITIVO                  | POSITIVO | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_03 | POSITIVO                  | POSITIVO | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_04 | NEGATIVO                  | NEGATIVO | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
| amostra_05 | POSITIVO                  | POSITIVO | POSITIVO                   | POSITIVO |
| amostra_06 | NEGATIVO                  | NEGATIVO | NEGATIVO                   | NEGATIVO |
|            | SORO                      | PLASMA   | SORO                       | PLASMA   |

**Figura 21:** Comparação entre os resultados finais das amostras de soro e plasma na etapa de especificidade. Na **tabela A** estão representados os resultados obtidos no teste PRA das amostras de soro e plasma referentes ao HLA classe I, enquanto na **tabela B** os resultados referentes ao HLA classe II na etapa de especificidade utilizando o kit *Labscreen™ Single Antigen*.

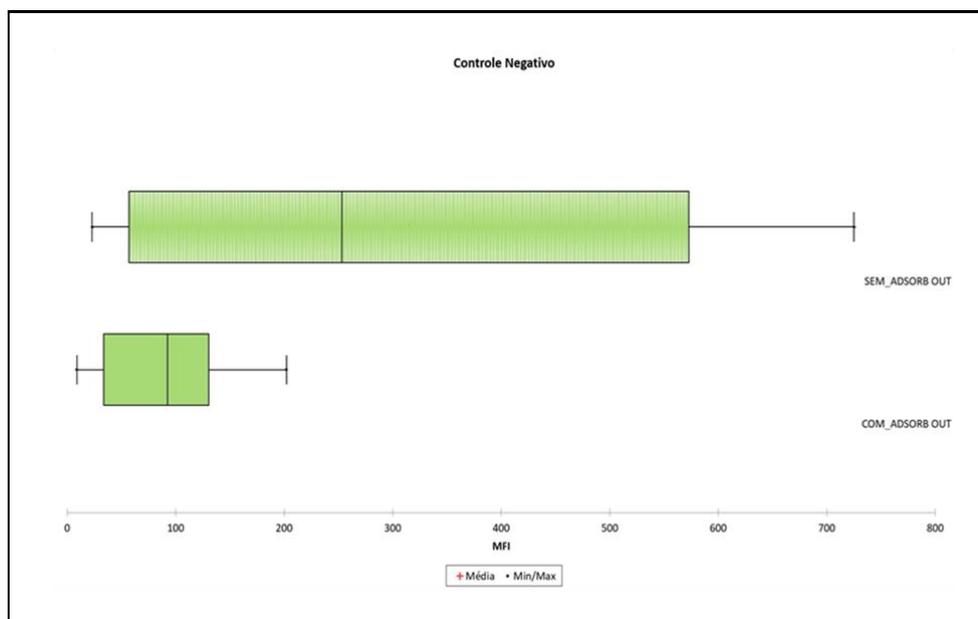
### 5.3 ETAPA 3: VALIDAÇÃO DAS ESPECIFICIDADES DE LIGAÇÃO

Durante a execução das etapas 1 e 2 deste trabalho foram identificadas amostras como a 1,5, e 8 da etapa de triagem da validação do kit e as amostras 1,2,5 da etapa de validação do plasma com controles negativos acima do sugerido pelo fabricante ( $CN < 300$ ). Conforme orientação do mesmo foi realizado um pré tratamento destas amostras com o kit *Adsorb out*.

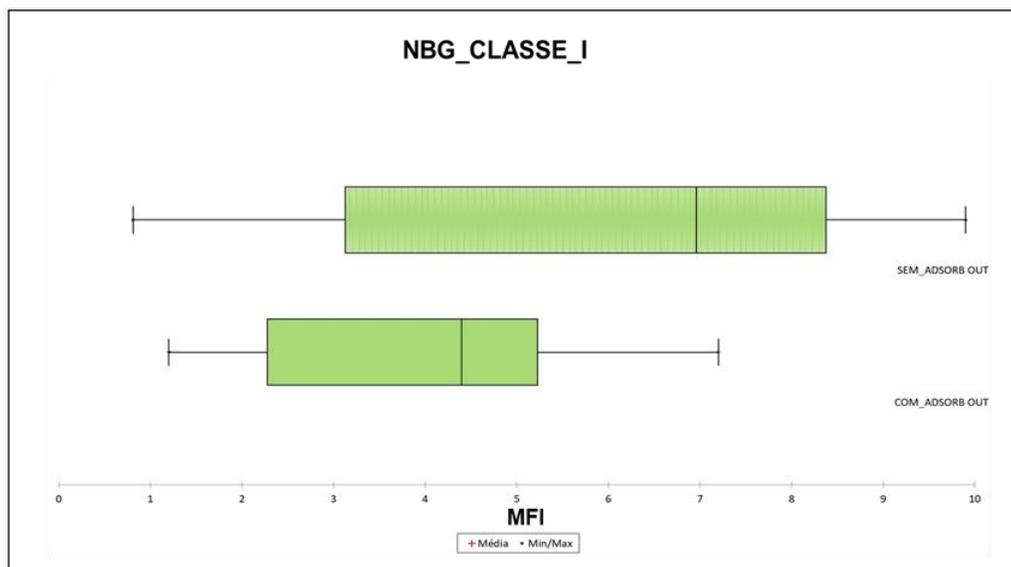
Este reagente é um composto formado por micropartículas tratadas com uma solução de bloqueio, sem revestimento de antígenos, que impedem as ligações inespecíficas na reação. Nesta etapa do trabalho foi realizada uma adsorção preliminar do material sem ligação específica do soro. Foram testadas 10 amostras de plasma para ambas as etapas. Primeiramente, na etapa de triagem foi observado uma diferença relevante entre as amostras tratadas e sem o tratamento com o reagente *Adsorb out* após o teste PRA. Estes resultados foram demonstrados no gráfico 1 e 2 quando comparados os valores de controle positivo e negativos. Ao analisarmos os valores de controle negativo demonstrados no gráfico 2, identificamos uma redução significativa (metade dos valores encontrados sem o pré tratamento) refletindo diretamente nos valores de NBG (gráficos 3 e 4).



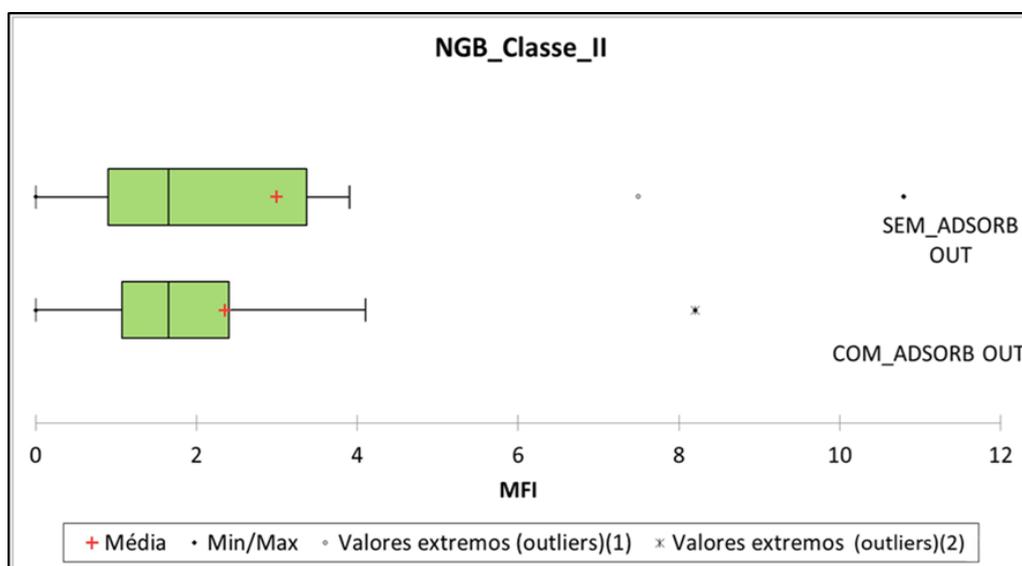
**Gráfico 1:** Neste gráfico está representado os controles positivos das amostras testadas com e sem *adsorb out* na etapa de triagem. Podemos observar o deslocamento do gráfico com *adsorb out* para a direita onde temos no eixo x os valores de MFI crescente dos CP.



**Gráfico 2:** Neste gráfico está representado os controles negativos das amostras testadas com e sem *adsorb out* na etapa de triagem. Podemos observar o deslocamento do gráfico com *adsorb out* e o encurtamento do mesmo para a esquerda onde temos no eixo x os valores de MFI decrescendo. Podemos observar valores de CN mais próximos no teste com *adsorb out*.



**Gráfico 3:** Neste gráfico está representado os valores de NBG do HLA classe I das amostras testadas com e sem adsorb out na etapa de triagem. Podemos observar o deslocamento do gráfico com adsorb out e o encurtamento do mesmo para a esquerda onde temos no eixo x os valores de MFI decrescendo.



**Gráfico 4:** Neste gráfico está representado os valores de NBG do HLA classe II das amostras testadas com e sem *adsorb out* na etapa de triagem. Podemos observar que duas amostras ficaram completamente fora da média no teste sem *Adsorb out* e após o tratamento sobrou apenas 1 amostra outliers

De acordo com o software de análise o controle negativo faz parte dos cálculos para obtenção do NBG, que quando estabelecido serve de linha de corte

para o resultado final do teste PRA na etapa de triagem. De acordo com essa informação e os resultados obtidos nesta etapa verificamos diferenças nos resultados finais de algumas amostras como demonstrado na figura 22.

| (A)              |                | (B)               |                |
|------------------|----------------|-------------------|----------------|
| MIXED - CLASSE I |                | MIXED - CLASSE II |                |
| Amostras         |                | Amostras          |                |
| amostra_01       | POSITIVO       | POSITIVO          | POSITIVO       |
| amostra_02       | POSITIVO       | NEGATIVO          | NEGATIVO       |
| amostra_03       | POSITIVO       | NEGATIVO          | NEGATIVO       |
| amostra_04       | NEGATIVO       | NEGATIVO          | NEGATIVO       |
| amostra_05       | POSITIVO       | INDETERMINADO     | INDETERMINADO  |
| amostra_06       | INDETERMINADO  | INDETERMINADO     | INDETERMINADO  |
| amostra_07       | POSITIVO       | POSITIVO          | POSITIVO       |
| amostra_08       | POSITIVO       | INDETERMINADO     | INDETERMINADO  |
| amostra_09       | POSITIVO       | POSITIVO          | POSITIVO       |
| amostra_10       | NEGATIVO       | NEGATIVO          | NEGATIVO       |
|                  | sem adsorb out |                   | com adsorb out |

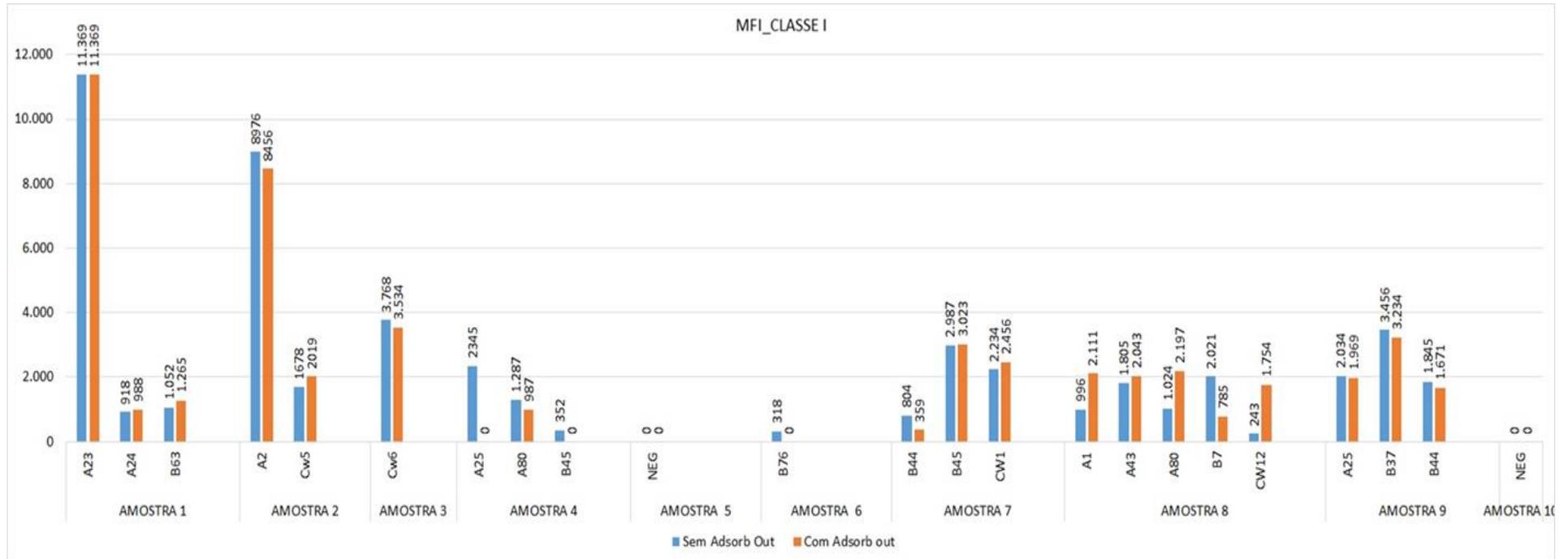
**Figura 22:** Comparação dos resultados finais das amostras de plasma com e sem o reagente Adsorb Out na etapa de triagem. **Em A** estão representados os resultados obtidos no teste PRA das amostras de plasma sem e com o pré tratamento referentes ao HLA classe I, enquanto **em B** os resultados referentes ao HLA classe II na etapa de triagem utilizando o kit *Labscreen™ Mixed*.

Como exemplo deste resultado podemos citar a amostra 8. Foi observado que o valor de controle positivo desta amostra dobrou quando tratada com o reagente e o Controle negativo reduzido pela metade aproximadamente. Com a redução do CN observou que o NBG para o HLA classe I também caiu pela metade, alterando assim o resultado final do teste, que antes era positivo e passou a indeterminado na etapa de triagem. Quando foi realizado o teste de especificidade observou-se anticorpos que antes eram negativos como o A1, e passaram a positivos com valores de MFI em torno de 2000 (Gráfico 5).

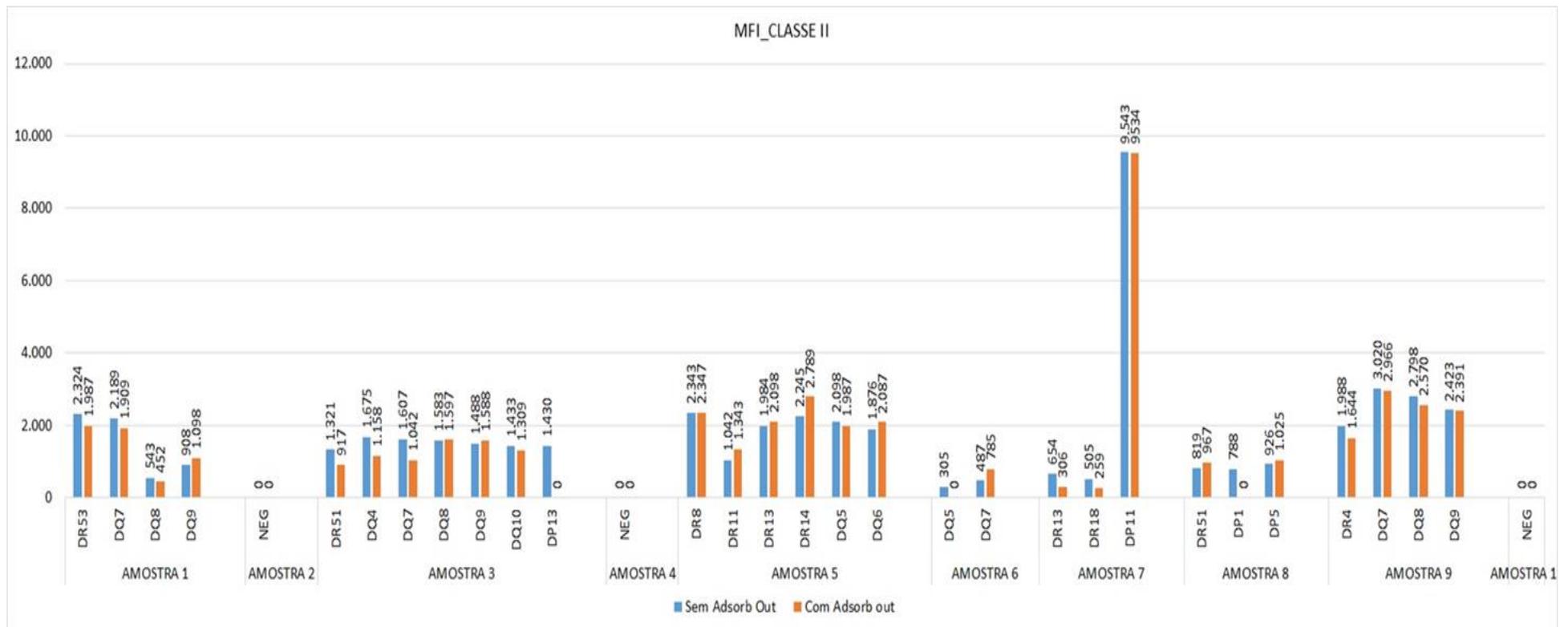
Ao analisarmos os resultados obtidos na etapa de especificidade foram identificadas diferenças relevantes a respeito da positividade e da presença dos anticorpos anti-HLA nas amostras. Estes resultados estão representados nos gráficos 5 e 6.

Essas diferenças podem ser vistas na amostra 2 (HLA classe I) por exemplo, onde foi observado o anticorpo Cw5 que antes do pré tratamento estava negativo com o MFI de 1678, após o pré tratamento este mesmo anticorpo passou a ser positivo (MFI de 2019) dentro dos parâmetros estabelecidos no laboratório em relação a linha de corte. Outro exemplo de como esta etapa de pré tratamento

tornou-se fundamental para o teste PRA em nosso laboratório foi o da amostra 6(HLA classe II) o qual o anticorpo DQ5 foi detectado no teste sem *adsorb out* e quando tratada com o reagente não foi mais detectada no teste, a amostra 4 (HLA classe I) também apresentou esse tipo de problema com o anticorpo A25.



**Gráfico 5:** Neste gráfico está representado os anticorpos HLA classe I detectados nas amostras com e sem o tratamento com o reagente *adsorb out*. No eixo y está representado a intensidade de fluorescência da reação e no eixo x as amostras. Os anticorpos detectados em cada amostra com e sem o pré tratamento está separado por barras.



**Gráfico 6:** Neste gráfico está representado os anticorpos HLA classe II detectados nas amostras com e sem o tratamento com o reagente *adsorb out*. No eixo y está representado a intensidade de fluorescência da reação e no eixo x as amostras. Os anticorpos detectados em cada amostra com e sem o pré tratamento está separado por barra.

#### 5.4 ETAPA 4: CERTIFICAÇÃO DE APTIDÃO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE PRA PELA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Ao longo deste trabalho o laboratório participou do teste do controle de qualidade da Associação Brasileira de histocompatibilidade- ABH nos anos de 2017 e 2018. No total 12 amostras de soro chegaram ao laboratório e foram realizados os testes de PRA nas duas etapas (triagem e especificidade). Os resultados obtidos foram de acordo com os parâmetros estabelecidos pela ABH. O número de identificação do nosso laboratório foi em 2017 o 06 e em 2018 o 64.

Nos testes de triagem (*Labscreen™ Mixed*) além dos controles positivo e negativo foram informados os valores da razão NBG para os resultados indeterminados e positivos. No teste de especificidade (*Labscreen™ single Antigen*) foi reportado uma tabela com os anticorpos detectados no teste. Todos os resultados assim como as certificações de 2017 e 2018 encontram-se no anexo 1.

De acordo com a avaliação de desempenho global da ABH participaram da realização do Teste modalidade PRA: triagem (Classe I e II) 26 laboratórios, dentre eles 24 obtiveram resultado satisfatório; Teste *Single Antigen* (Classe I e II) participaram 34 laboratórios, dentre eles 29 obtiveram resultados satisfatórios. O laboratório obteve os resultados satisfatório para ambas as etapas, ao final das duas rodadas anual recebemos o **Certificado de Excelente** no Controle de Qualidade da ABH no ano de 2017 e 2018.

Na figura 23 estão representas os resultados reportados pelos laboratórios das 3 amostras testadas na 1ª rodada para o HLA classe I e II na etapa de triagem (Mixed= screening). O nosso laboratório nesta rodada foi o de número 6. Os resultados referentes a segunda rodada de 2017 e as duas rodadas de 2018 encontrem-se em anexo.

Na figura 24, encontra-se o resumo dos resultados da figura 23 com o consenso obtido entre os laboratórios. Nesta etapa (triagem) todas amostras apresentaram consenso dentro do que foi reportado.

| Laboratório |  | Screening Classe I |            |            | Laboratório |          | Screening Classe II |            |            |
|-------------|--|--------------------|------------|------------|-------------|----------|---------------------|------------|------------|
|             |  | Amostra 76         | Amostra 77 | Amostra 78 |             |          | Amostra 76          | Amostra 77 | Amostra 78 |
| 3           |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 3           | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 4           |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 4           | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 6           |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 6           | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 8           |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 8           | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 11          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 11          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 13          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 13          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 14          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 14          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 15          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 15          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 16          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 16          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 17          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 17          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 23          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 23          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 25          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 25          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 26          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 26          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 27          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 27          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 32          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 32          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 33          |  | NR                 | NR         | NR         | 33          | NR       | NR                  | NR         |            |
| 35          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 35          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 37          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 37          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 39          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 39          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 41          |  | NR                 | NR         | NR         | 41          | NR       | NR                  | NR         |            |
| 44          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 44          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 45          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 45          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 47          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 47          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 48          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 48          | POSITIVO | POSITIVO            | NR         |            |
| 50          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 50          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 52          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 52          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 53          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 53          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |
| 55          |  | POSITIVO           | POSITIVO   | POSITIVO   | 55          | NEGATIVO | POSITIVO            | POSITIVO   |            |

**Figura 23:** Resultados reportados pelos laboratórios participantes do teste PRA na etapa de triagem do controle de qualidade da ABH 2017. Nesta figura está representado os resultados HLA classe I e classe II de todos os laboratórios participantes. O laboratório de imunogenética nesta rodada teve o número de identificação 6.

|              | RESULTADOS - Screening classe I |            |            |              | RESULTADOS - Screening classe II |            |            |
|--------------|---------------------------------|------------|------------|--------------|----------------------------------|------------|------------|
|              | Amostra 76                      | Amostra 77 | Amostra 78 |              | Amostra 76                       | Amostra 77 | Amostra 78 |
| TOTAL        | 28                              | 28         | 28         | TOTAL        | 28                               | 28         | 28         |
| POSITIVO     | 26                              | 26         | 26         | POSITIVO     | 1                                | 26         | 25         |
| NEGATIVO     | 0                               | 0          | 0          | NEGATIVO     | 25                               | 0          | 0          |
| NÃO REPORTOU | 2                               | 2          | 2          | NÃO REPORTOU | 2                                | 2          | 3          |
|              | Consenso                        | Consenso   | Consenso   |              | Consenso                         | Consenso   | Consenso   |

**Figura 24:** Resumo dos resultados e o consenso entre os laboratórios participantes. Nesta figura está representada as tabelas referentes aos resultados classe I e classe II reportados por todos os laboratórios participantes de cada amostra. Estas tabelas informam quantos laboratórios tiveram os prováveis resultados na etapa de triagem (screening) e a avaliação por parte da ABH do consenso encontrado.

Para a etapa de especificidade, foram informados os anticorpos anti- HLA classe I e classe II encontrados em cada amostra. Na tabela 3, encontra o resultado de 1 dos testes realizados em nosso laboratório. Para esta amostra foram reportadas 22 especificidades de anticorpos anti- HLA classe I sendo que delas 6 obtiveram consenso com 80% dos laboratórios e 16 especificidades o consenso foi na faixa de 6%- 64% dos laboratórios. O Painel de especificidades das outras amostras encontra-se em anexo.



Tabela 4: Painel de antígenos classe II da amostra 77

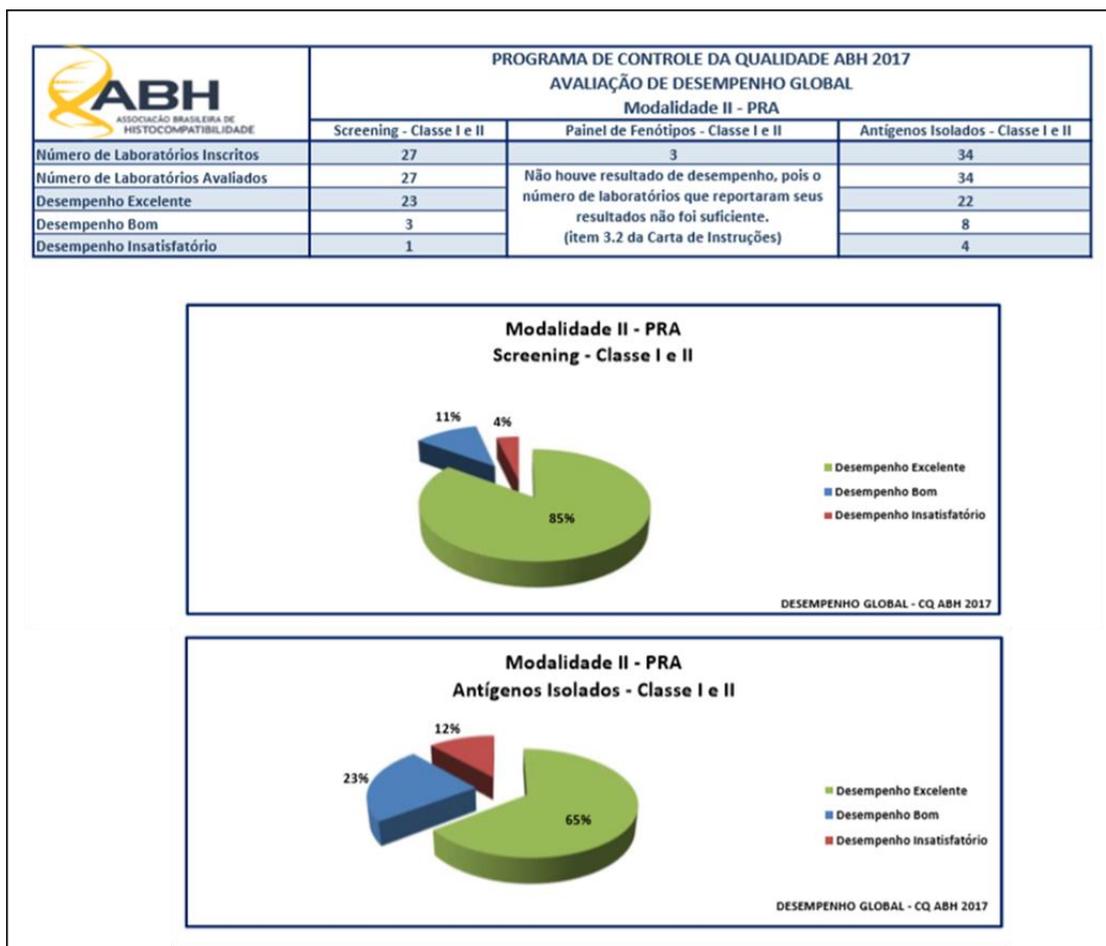
|  |              | CONTROLE DE QUALIDADE ABH - 2017                      |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
|---|--------------|---|------|------|------|-----|-----|-----|---------|---------|--|
|   |              | Painel de Antígenos Isolados - Classe II - amostra 77 |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| Laboratório   | DR4          | DR13  | DR14 | DR16 | DR17 | DQ4 | DQ5 | DQ6 | DQA1*01 | DQA1*03 |  |
| 3   |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 4   |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 5   |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 6   |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 8   |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 10  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 11  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 13  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 15  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 16  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 17  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 23  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 25  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 26  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 32  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 33  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 34  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 35  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 37  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 38  | Não Reportou |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 39  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 41  | Não Reportou |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 42  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 43  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 44  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 45  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 46  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 47  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 48  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 50  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 51  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 52  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 53  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 54  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
| 55  |              |   |      |      |      |     |     |     |         |         |  |
|   | DR4          | DR13  | DR14 | DR16 | DR17 | DQ4 | DQ5 | DQ6 | DQA1*01 | DQA1*03 |  |

| Especificidades reportadas | DQ5 | DQ6 | DQ4 | DQA1*01 | DR4 | DQA1*03 | DR16 | DR13 | DR14 | DR17 |
|----------------------------|-----|-----|-----|---------|-----|---------|------|------|------|------|
| Nº de laboratórios         | 32  | 32  | 30  | 13      | 6   | 6       | 5    | 2    | 2    | 2    |
| %                          | 97% | 97% | 91% | 39%     | 18% | 18%     | 15%  | 6%   | 6%   | 6%   |

Especificidades validadas pelo consenso de 80% das especificidades reportadas.

Especificidades intermediárias reportadas pelos laboratórios participantes entre 6 a 39%.

Por último, foi representado na figura 25 o desempenho global dos laboratórios no teste de proficiência do controle de qualidade da ABH de 2017 para a etapa de triagem (Screening = *mixed*) e de especificidade (Painel de antígenos isolados = *Single Antigen*). A partir destes gráficos podemos observar que a maioria dos laboratórios participantes tiveram um desempenho excelente nesta metodologia.

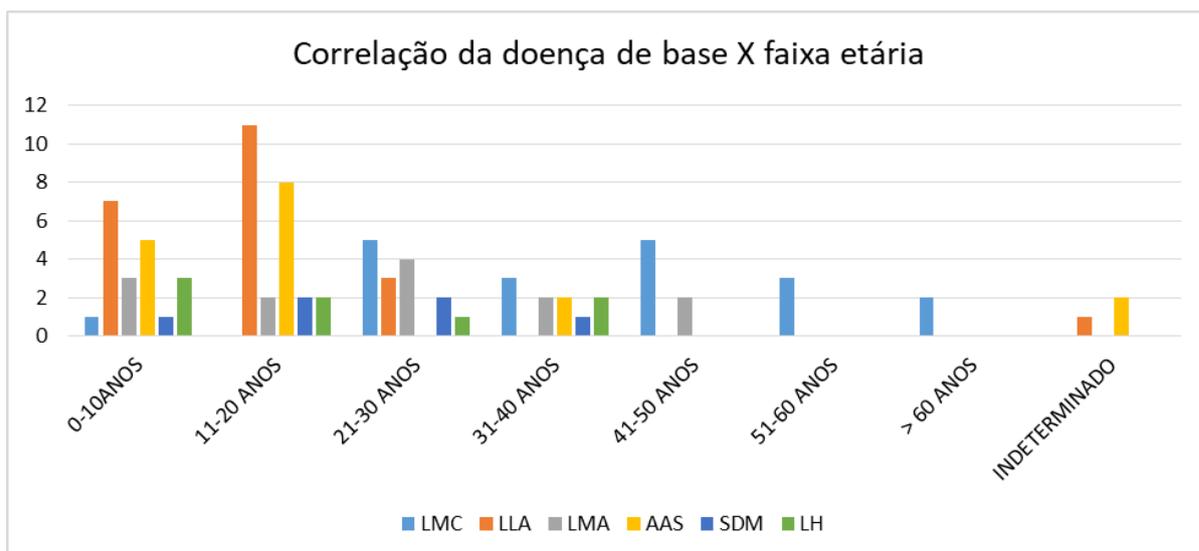


**Figura 25:** Resultado do desempenho global dos laboratórios em relação ao teste PRA nas etapas de triagem e especificidade da avaliação de desempenho global do teste de proficiência do controle de qualidade da ABH 2017.

## 5.5 ETAPA 5 :IMPLEMENTAÇÃO DO TESTE PRA NA ROTINA DO LABORATÓRIO

Para a implementação do teste na rotina do laboratório foi criado um POP, o qual passou pela aprovação das chefias, do setor de qualidade do laboratório e pelo setor responsável da rede INCa de informática. Este documento encontra-se disponível no sistema interno do INCA (INTRANET-normatiza-consulta-cemo-divisão de laboratório- células-tronco- nº3052800012- Pesquisa de anticorpos contra painel -PRA). O pop encontra-se no anexo 2

Durante o período de setembro de 2017 até junho de 2019 foram realizados 85 testes PRA nos pacientes candidatos ao TACTH haploidêntico, deste total apenas 36 realizaram o transplante. A maioria dos pacientes indicados para esta modalidade de transplante submetidos ao teste PRA era do sexo masculino (46) e encontravam-se na faixa etária entre 0 a 40 anos. As três doenças de base mais indicada para o transplante haploidêntico observada neste estudo foi a leucemia linfóide aguda (22) seguida da leucemia mielóide crônica (19) e anemia aplásica severa (17). A relação da doença de base e faixa etária estão relacionados no gráfico 7.



**Gráfico 7:** No gráfico está representado a correlação da doença de base dos pacientes candidatos ao TACTH haploidêntico submetidos ao teste PRA em relação a faixa etária. No eixo Y está representado o número de pacientes. No eixo X a faixa etária. As doenças estão separadas por cores e estão agrupadas de acordo com a faixa etária do paciente.

Em relação ao grau de parentesco dos doadores, o mais frequente foi o pai (21) seguidos dos irmãos (8) e por último a mãe (7). Dos 85 pacientes submetidos ao PRA, 20 foram a óbito sendo 14 antes do transplante, devido ao agravamento da doença, e pós transplante.

Em relação ao teste PRA dos 36 pacientes transplantados, 18 apresentaram PRA negativo tanto para classe I quanto para classe II, 5 apresentaram PRA positivo para ambas as classes, 7 pacientes com PRA positivo somente para classe I e 6 pacientes PRA positivo para classe II. Dentro deste grupo 10 pacientes apresentaram complicações pós transplante até o momento. Quatro deles apresentaram DECH aguda, 3 DECH crônica e 3 rejeições. Destas complicações nenhuma foi relacionada com os anticorpos anti-HLA.

## 6. DISCUSSÃO

A reatividade de anticorpos contra um painel de antígenos HLA (PRA) é um método altamente sensível e específico empregado mundialmente para avaliar o status imunológico dos pacientes que se encontram na fila de um transplante. A identificação da especificidade dos anticorpos circulantes no sangue do paciente para a molécula HLA constitui-se em uma das mais importantes avaliações imunológicas pré-transplante de órgãos sólidos (Ho, E.K. *et al.*, 2008). Nos transplantes de células-tronco hematopoiéticos essa metodologia vem sendo utilizada mais recentemente, devido a modificações realizadas nos protocolos de condicionamento e na descoberta de novas drogas imunossupressoras (Saboya *et al.*, 2010).

Esse exame é realizado para determinar o grau de sensibilização do paciente em uma dada população antes do procedimento e para seguimento imunológico do paciente após o transplante, visando identificar alterações iniciais relacionadas com um possível episódio de rejeição nos transplantes de órgãos sólidos. Já nos transplantes haploidênticos a busca de anticorpos é realizada para identificar um melhor doador dentro do âmbito familiar e auxiliar o corpo clínico nos protocolos pré e pós transplantes.

Atualmente o padrão-ouro para detecção de anticorpos anti-HLA é o teste PRA utilizando microesferas magnéticas a qual utiliza a tecnologia Luminex (Ho, E.K. *et al.*, 2008). Para esta metodologia é utilizado o kit comercial *Labscreen*<sup>™</sup> da empresa *One Lambda*.

Este kit foi criado a princípio para atender as necessidades relacionadas ao transplante renal. Por este motivo associado aos inúmeros estudos ocorridos a longos anos, a padronização dos protocolos do teste PRA já se encontram muito bem estabelecidos e em consenso entre os laboratórios. Porém para o transplante haploidêntico esses parâmetros ainda não estão padronizados e muitos estudos vem sendo realizados para o esclarecimento do papel desses anticorpos na resposta imunológica pós TACTH haploidêntico.

Este trabalho foi desenvolvido a partir da necessidade de um protocolo específico para esta modalidade de transplante, com a finalidade de se definir tipo

de amostra, tipos de pré tratamento e valores de corte para os resultados positivos.

De acordo com a literatura e o próprio protocolo do kit para o desenvolvimento do teste é utilizado amostras de soro (Biometrix, 2019). Porém a demanda em nosso laboratório é de amostras de sangue em tubo comercial contendo EDTA, resolvemos antes de rejeitar estas amostras, testá-las comparando os resultados com as amostras de soro.

Embora o artigo de Anani *et al.*, 2016 não recomende a utilização do plasma para o teste de PRA, resolvemos compará-las com as de soro tratadas com EDTA, segundo o artigo de Andrew Connor (Carey *et al.*, 2016). Não foram observadas diferenças nos anticorpos detectados em ambas as amostras.

Logo nas primeiras etapas deste trabalho observamos que algumas amostras apresentaram valor de controle negativo acima do sugerido pelo fabricante (CN < 300) desta forma seguindo a orientação do kit tratamos as mesmas com uma solução de bloqueio (Biometrix, 2019). Esta solução chamada de reagente *Adsorb out*, é utilizada para remover ligações inespecíficas nas microesferas de látex, com este tratamento foi observado não só melhorava nos valores de controle negativo, mais também no controle positivo e no NBG. Diante desta observação resolvemos aumentar o número de amostras para este teste e após a realização do PRA verificamos que o pré-tratamento com o *adsorb out*, interferia no resultado final do teste, como observado nas amostras 2, 4, 6 por exemplo. Anticorpos que antes eram negativos de acordo com a nossa linha de corte, passaram a positivos depois do pré-tratamento, outros que não eram detectados pelo kit, apresentaram positividade e vice-versa.

Após aceitarmos as amostras de plasma para o teste e incluirmos a etapa de pré-tratamento com *adsorb out* em nosso protocolo, passamos a realizar os testes de PRA nos pacientes candidatos ao transplante haploidêntico do CEMO, e acompanhar a evolução dos mesmos. Observamos por exemplo, que o grupo de pacientes com a doença de base anemia aplástica, que antes não tinha um bom prognóstico e muitos chegavam ao óbito, com a implementação da metodologia PRA auxiliando na conduta clínica hoje encontram-se transplantados e com um bom prognóstico.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi implementada com êxito a rotina do teste PRA para os pacientes candidatos ao transplante haploidêmico. Para isto primeiramente testamos amostras comparando-as com os resultados obtidos em laboratório de referência e obtivemos consenso em todos os resultados. Em seguida foram realizados testes nos quais foram observados que as amostras de plasma poderiam ser utilizadas no teste PRA da mesma forma que as de soro tratado com o reagente EDTA.

De acordo com nossos resultados foi observado que o pré-tratamento das amostras com a solução de bloqueio teve um impacto direto no resultado de ambas as etapas realizadas com o Kit comercial *Labscreen*<sup>TM</sup>, estabelecendo assim o pré-tratamento com o reagente *Adsorb out*, obrigatório na etapa que antecede o protocolo do kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Mixed* e kit *Labscreen*<sup>TM</sup> *Single Antigen*.

Ao longo da execução do presente estudo o laboratório passou por dois testes de proficiência da Associação Brasileira de Histocompatibilidade e obteve o na certificação o desempenho excelente nos testes de controle de qualidade da ABH.

Dos pacientes que realizaram o teste PRA e foram transplantados (36) apenas dez tiveram complicações pós transplantes, nenhuma delas relacionadas aos anticorpos anti-HLA.

A metodologia da pesquisa de anticorpos anti-HLA contra um painel de antígenos HLA (PRA) mostrou-se de fundamental importância para esta modalidade de TACTH. De acordo com o estudo apresentado, a detecção destes anticorpos é decisiva para a melhor escolha de um doador haploidêmico e de um protocolo específico para o paciente pós-transplante.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a. p.564.

\_\_\_\_\_. Imunologia do transplante. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008b. cap. 16, 564, p.375-396.

ANANI, W. Q.; ZEEVI, A.; LUNZ, J. G. EDTA Treatment of Serum Unmasks Complement-Mediated Prozone Inhibition in Human Leukocyte Antigen Antibody Testing. *Am J Clin Pathol*, v. 146, n. 3, p. 346-52, Sep 2016. ISSN 1943-7722 (Electronic) 0002-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543980> >.

AYALA GARCIA, M. A. et al. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant*, v. 2012, p. 842141, 2012. ISSN 2090-0015 (Electronic) 2090-0007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22778908> >.

BENDER, K. The HLA System. *Biotest Diagnostics*. In: (Ed.). 5 ed., 1991.

BIOMETRIX. 2019. Disponível em: < <https://www.biometrix.com.br/one-lambda-deteccao-anticorpo/labscreen-autoantibody/> >. Acesso em: 08/07/2019.

CARO-OLEAS, J. L. et al. Donor-specific antibody detection: comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches. *Tissue Antigens*, v. 76, n. 5, p. 398-403, Nov 2010. ISSN 1399-0039 (Electronic) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630037> >.

CAREY, B. S. et al. A reliable method for avoiding false negative results with Luminex single antigen beads; evidence of the prozone effect. *Transpl Immunol*, v. 37, p. 23-27, Jul 2016. ISSN 1878-5492 (Electronic) 0966-3274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27109036> >.

EL-AWAR, N.; LEE, J.; TERASAKI, P. I. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol*, v. 66, n. 9, p. 989-97, Sep 2005. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360839> >.

EL-AWAR, N. et al. Almost all patients who are waiting for a regraft of a kidney transplant have anti-HLA antibodies. *Transplant Proc*, v. 34, n. 7, p. 2531-2, Nov 2002. ISSN 0041-1345 (Print) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431512> >.

GATTI, E.; PIERRE, P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biol*, v. 15, n. 4, p. 468-73, Aug 2003. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892788> >.

HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*, v. 5, n. 12, p. 889-99, Dec 2004. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573121> >.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Auto-Imunidade e Transplante. In: (Ed.).

**Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.** 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007a. cap. 13, p.549-558.

\_\_\_\_\_. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. In: (Ed.). 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007b. p.848.

KASAMON, Y. L. et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 16, n. 4, p. 482-9, Apr 2010. ISSN 1523-6536 (Electronic)  
1083-8791 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925877> >.

KERBAUY, F. R.; RIBEIRO, A. A. F. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. In: (Ed.). In: **HAMERSCHLAK, Nelson (Org.). Manual de hematologia.** Barueri: Manole, 2010. p.cap 38, p. 299-304.

KLEIN, J. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. In: (Ed.). New York: John Wiley and Sons: New York., 1986. p.775 pages.

LARSEN, C. P.; MORRIS, P. J.; AUSTYN, J. M. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. **J Exp Med**, v. 171, n. 1, p. 307-14, Jan 1 1990. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404081> >.

LEGER, C. S.; NEVILL, T. J. Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician. **CMAJ**, v. 170, n. 10, p. 1569-77, May 11 2004. ISSN 0820-3946 (Print)  
0820-3946 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136552> >.

MARSH, S. G. E. et al. 7 - HLA Class I and II Molecules Present Peptide Antigens to Different Types of T Cell. In: (Ed.). **The HLA FactsBook.** London: Academic Press, 2000a. p.40-45.

\_\_\_\_\_. 11 - HLA POLymorphism, Peptide-binding Motifs and T-Cell Epitopes. In: (Ed.). **The HLA FactsBook.** London: Academic Press, 2000b. p.61-72.

\_\_\_\_\_. 12 - Evolution and Anthropology of HLA. In: (Ed.). **The HLA FactsBook.** London: Academic Press, 2000c. p.73-78.

\_\_\_\_\_. 13 - HLA and Disease. In: (Ed.). **The HLA FactsBook.** London: Academic Press, 2000d. p.79-83.

MENDES, M. L.; BITTENCOURT, H. N. D. S.; DUSSE, L. M. S. A. Fontes de células no transplante de células-tronco hematopoéticas. **RBAC**, v. 42, n. 1, p. 3-7, Jan 2010. Disponível em: < [http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/08/RBAC\\_Vol42\\_n1-Completa.pdf](http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/08/RBAC_Vol42_n1-Completa.pdf) >.

MESTER, G.; HOFFMANN, V.; STEVANOVIC, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 9, p. 1521-32, May 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic)  
1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387142> >.

NEDELEC, Y. et al. Genetic Ancestry and Natural Selection Drive Population Differences in Immune Responses to Pathogens. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 657-669 e21, Oct 20 2016. ISSN

1097-4172 (Electronic)  
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27768889> >.

PATEL, R.; TERASAKI, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **N Engl J Med**, v. 280, n. 14, p. 735-9, Apr 3 1969. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4886455> >.

PATTISON, J. M.; KRENSKY, A. M. New insights into mechanisms of allograft rejection. **Am J Med Sci**, v. 313, n. 5, p. 257-63, May 1997. ISSN 0002-9629 (Print) 0002-9629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145033> >.

PEI, R. et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. **Transplantation**, v. 75, n. 1, p. 43-9, Jan 15 2003. ISSN 0041-1337 (Print) 0041-1337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544869> >.

PORTO, L.; PONTES, L. In: (Ed.). **Estudos De Associação Hla X Doenças: EXTRATOS DO I SIMPOSIO BRASILEIRO**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Eduerj, 2007. p.242. ISBN 97885751111.

SABOYA, R. et al. Transplante de medula óssea com doador familiar parcialmente compatível. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Ribeirão Preto**, v. 32, p. p. 13-15, Jan 2010. Disponível em: < [https://bdpi.usp.br/bitstream/handle/BDPI/8933/art\\_SABOYA\\_Transplante\\_de\\_medula\\_os\\_sea\\_com\\_doador\\_familiar\\_2010.pdf?sequence=1](https://bdpi.usp.br/bitstream/handle/BDPI/8933/art_SABOYA_Transplante_de_medula_os_sea_com_doador_familiar_2010.pdf?sequence=1) >.

SHIINA, T. et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. **J Hum Genet**, v. 54, n. 1, p. 15-39, Jan 2009. ISSN 1435-232X (Electronic) 1434-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158813> >.

SYMONS, H. J.; FUCHS, E. J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. **Bone Marrow Transplant**, v. 42, n. 6, p. 365-77, Sep 2008. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679375> >.

SZYDLO, R. et al. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. **J Clin Oncol**, v. 15, n. 5, p. 1767-77, May 1997. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164184> >.

TAIT, B. D. et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. **Transplantation**, v. 95, n. 1, p. 19-47, Jan 15 2013. ISSN 1534-6080 (Electronic) 0041-1337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238534> >.

TERASAKI, P. I.; OZAWA, M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. **Am J Transplant**, v. 4, n. 3, p. 438-43, Mar 2004. ISSN 1600-6135 (Print) 1600-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961999> >.

VILCHES, M.; NIETO, A. Analysis of Pregnancy-Induced Anti-HLA Antibodies Using Luminex Platform. **Transplant Proc**, v. 47, n. 9, p. 2608-10, Nov 2015. ISSN 1873-2623 (Electronic) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26680049> >.

VOLTARELLI, J.; PASQUINI R; ORTEGA ETT. Transplante de Células-Tronco

Hematopoéticas. In: (Ed.). São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

WANG, Y. et al. Superior graft-versus-leukemia effect associated with transplantation of haploidentical compared with HLA-identical sibling donor grafts for high-risk acute leukemia: an historic comparison. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 17, n. 6, p. 821-30, Jun 2011. ISSN 1523-6536 (Electronic) 1083-8791 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831895> >.

YEWDELL, J. W.; REITS, E.; NEEFJES, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 12, p. 952-61, Dec 2003. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647477> >.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. In: (Ed.). São Paulo: Editora Atheneu, 2001

