

SOFTWARE XHLA – FERRAMENTA PARA SELEÇÃO DE RECEPTORES HIPERSENSIBILIZADOS.

Herton Luiz Alves Sales Filho (bolsista PIBIC-CNPQ), Pedro de Alcântara dos Santos Neto (colaborador, Departamento de Informática e Estatística - UFPI), Adalberto Socorro da Silva (colaborador, Departamento de Biologia - UFPI), Luiz Cláudio Demes da Mata Sousa (co-orientador, Departamento de Informática e Estatística – UFPI), Semíramis Jamil Hadad do Monte (orientadora, Departamento de Parasitologia e Microbiologia - UFPI).

1- Introdução:

Transplante de órgãos e tecidos é uma modalidade terapêutica universal na prática médica. Contudo, a tarefa de encontrar um rim compatível tem se mostrado difícil sobretudo para receptores que tem anticorpos pré-formados contra os antígenos HLA não-próprios encontrados no restante da população. Tais receptores, denominados hipersensibilizados, acabam esperando um tempo maior que os demais receptores na maioria dos programas de transplante de órgãos e tecidos (CLAAS *ET AL.*, 2004). Uma das estratégias para solucionar tal problema, é a identificação dos antígenos HLA não-próprios para os quais um receptor não apresenta anticorpo pré-formados, tais moléculas são consideradas incompatibilidades aceitáveis para o transplante (do inglês “Acceptable Mismatches”). A identificação dos Mismatches aceitáveis foi otimizada com a utilização do algoritmo HLAMatchmaker desenvolvido por René Duquesnoy, que descreve os epítomos funcionais (eplets) das moléculas do sistema HLA (DOXIADIS; DUSQUENOY, 2005). A utilização de tal algoritmo diminui o tempo de espera em lista e aumenta o tempo de sobrevida do enxerto em receptores hipersensibilizados (CLAAS *ET AL.*, 2004). Contudo a análise com o algoritmo HLAMatchmaker possui uma série de etapas intermediárias manuais que tornam o processo lento, caro e difícil de aplicar na rotina clínica do transplante. Para solucionar tal limitação, o nosso grupo desenvolveu o software xHLA: uma ferramenta que automatiza a análise com o algoritmo HLAMatchmaker. O objetivo do presente estudo foi realizar a validação estatística do software xHLA para que o mesmo possa ser utilizado na rotina diagnóstica dos laboratórios de histocompatibilidade.

2- Metodologia

Avaliadores e testes de detecção de anticorpo anti-HLA utilizados: onze avaliadores foram selecionados para analisar 10 testes para anticorpo anti-HLA realizados com o soro de 10 receptores hipersensibilizados (painel reativo de anticorpos calculado superior a 85%). Todos os avaliadores analisaram os mesmos testes pelo método convencional (algoritmo HLAMatchmaker) e automatizado (software xHLA). Quatro avaliadores pertencem ao corpo técnico do Laboratório de Imunogenética da PUC-PR, e os 7 demais são estudantes de graduação da UFPI da área de Biológicas e Saúde sem experiência prévia em Imunogenética.

Variáveis estudadas: tempo para realização das análises em minutos, número de eplets contabilizados em cada teste, número de “Acceptable Mismatches” (AMM) identificados em cada teste, número de erros de eplets e de AMM que geraram discordâncias entre os métodos convencional e automatizado. Observações: (i) durante a análise cada eplet (epítomo funcional) não-próprio é classificado quanto a imunogenicidade em reativo e não-reativo dependendo da sua presença ou não nos antígenos HLA para os quais se detectou anticorpo pré-formado, (ii) as análises são realizadas para os antígenos HLA de classe I e de classe II em planilhas Excell separadas.

Análise estatística: Teste t de Student ou de Mann-Whitney para analisar a variável tempo ($p < 0,05$). Teste de razão de verossimilhança após a distribuição de Poisson para as variáveis Número de erros de eplets e de AMM, adotando valor de Lambda igual 0,1 ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão.

O Tempo médio para análise dos casos com o método convencional é 5,50 vezes maior que o tempo médio de análise com o método automatizado na PUC-PR e 10,37 vezes na UFPI (Tabela 1, teste t, $p < 0,0001$). Tal resultado é relevante, pois a eficiência em gerar resultados ganhou a mesma importância da acurácia dos mesmos (PUMAROLA, 2010) e a expectativa é que a utilização do software xHLA reduzirá o tempo necessário para análise de testes de anticorpo anti-HLA com o algoritmo HLAMatchmaker.

Tabela 1 – Tempo em minutos para análise com o algoritmo HLAMatchmaker (HLAMM) e com o software xHLA por grupo de avaliadores.

Grupos	HLAMM	xHLA
PUC-PR	57.93 ± 13.58	10.53 ± 3.17
UFPI	87.41 ± 28.84	8.43 ± 3.27
Total	76.69 ± 28.20	9.19 ± 3.37

Os dados são mostrados média ± desvio padronizado, PUC-PR (n=40), UFPI (N=70), Total (N=110).

O número de eplets identificados em cada teste foi o mesmo para todos os avaliadores. Em HLA de classe I foram classificados 72,908 eplets, somente em 1 eplet a classificação da imunogenicidade discordou entre método convencional e o automatizado. Em HLA de classe II, 11 eplets foram discordantes para imunogenicidade de um total de 58,018 eplets classificados (Tabela 2). De posse da classificação de eplets foi possível determinar os alelos HLA que são AMM em cada teste, totalizando 5885 para HLA classe I e 4900 para HLA de classe II nos 110 testes. O Número de erros de AMM para foi respectivamente 7 e 14. A revisão dos casos com erro evidenciou falha na aplicação manual do algoritmo (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de erros de eplets e AMM gerando discordâncias entre o método convencional de análise - algoritmo HLAMatchmaker - e o método automatizado - software xHLA - nos 110 testes analisados.

Nº de erros	Nº de testes em HLA de classe 1		Nº de testes em HLA de classe 2	
	Eplet N=72.908	AMM N=5.885	Eplet N=58.018	AMM N=4.900
0	109	108	108	103
1	1	0	0	3
2	0	0	0	1
3	0	1	0	3
4	0	1	0	0
5	0	0	1	0
6	0	0	1	0
Número de Erros/ Total de Eplets ou de AMMs	1/72.908	7/5.885	11/58.018	14/4.900
Número de Testes com Erro / Total de Testes	1/110	2/110	2/110	7/110

Logo, outra vantagem do uso do software xHLA é a eliminação de erros sistemáticos. Portanto, uma ferramenta computacional e uma base de dados relacional reduz potenciais erros de análise, aumenta a reprodutibilidade dos estudos de histocompatibilidade, facilita o manejo dos dados tornando análise dos mesmos menos trabalhosa e mais fácil de aplicar a clínica.

Mesmo os raros erros geradas devido falhas na análise convencional, não são suficientes para tornar a acurácia dos métodos estatisticamente distinta no teste de razão de verossimilhança (Tabela 3). Sendo assim o método automatizado pode substituir com vantagem o método convencional de análise com o algoritmo HLAMatchmaker na rotina dos laboratórios clínicos de histocompatibilidade.

Tabela 3 – Teste de razão de verossimilhança após distribuição de Poisson para os Números de Erros encontrados comparando método convencional e automatizado de análise com o algoritmo HLAMatchmaker nos 110 testes analisados.

	Erros de eplets	Erros de AMM
Classe 1	p = 0,99	p = 0,85
Classe 2	p = 0,42	p = 0,14

Valores de $p > 0.05$ nos mostram que a discordância entre os métodos não é estatisticamente significativa.

4- Conclusão

O software xHLA facilita a obtenção de resultados semelhantes ao obtidos com o uso do algoritmo HLAMatchmaker em um tempo significativamente menor e com acurácia perfeita. Tal fato mostra que o software xHLA está pronto para ser utilizado na rotina clínica de transplante de órgãos e tecidos.

5- Apoio CNPq/CAPES/UFPI.

6- Referências bibliográficas

CLAAS, F. H. J.; WITVLIET, M. D.; DUQUESNOY, R. J.; PERSIJN, G. G., DOXIADIS, I. I. N. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. **Transplantation**, United States; v. 78, pp 190-193, 2004.

DOXIADIS, I. I. N.; DUQUESNOY, R. J. Extending options for highly sensitized patients to receive a suitable kidney graft. **Current Opinion in Immunology**, England; v. 17, pp. 536-540, 2005.

PUMAROLA, T. Influence of new technologies in modern microbiology. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, Spain; v. 28, pp. 59-62, 2010.

Palavras-chave: xHLA. HLAMatchmaker. Receptor hipresensibilizado.