

## INFORME CIENTÍFICO II

# Técnica alternativa para fechamento de placas de microtécnica em exames de histocompatibilidade HLA

Sérgio Ré de Paiva<sup>1</sup>, Tácia Maria Cordeiro de Paiva<sup>2</sup>, Luciane Faria de Souza Pontes<sup>3</sup>, Fábio Cupertino Morínigo<sup>4</sup>

### Resumo

O Sistema HLA é composto por glicoproteínas integrais de membrana: as moléculas HLA A, B, C, DR, DQ e DP. Entre as principais aplicações desse sistema encontram-se os estudos para os transplantes de medula óssea. Um importante avanço metodológico no estudo do sistema HLA surgiu com a descrição de um teste de microlinfocitotoxicidade: uma microtécnica empregada até os dias de hoje, na qual células portadoras dos HLA são utilizadas como alvo em reações de citotoxicidade desenvolvidas em microplacas específicas (*placas Terasaki*). A etapa final do método consiste na cobertura da placa com laminula de vidro e leitura ao microscópio óptico de luz invertida. O presente trabalho apresenta uma técnica alternativa de fechamento da placa Terasaki que permite a leitura em microscópio óptico comum. Resume-se na colocação de um preparado tipo "gel" (Gelatina de Kaiser modificada) sobre a placa Terasaki ao término da metodologia usual, permitindo a inversão da mesma para leitura em microscópio óptico comum. O procedimento técnico de sorologia HLA é desenvolvido normalmente, e após coloração com eosina e fixação com formol neutro, a gelatina é dispensada na placa vagarosamente, devendo cobri-la homogeneamente. A preparação é deixada então à temperatura ambiente até que atinja o estado "gel". A leitura é feita em microscópio óptico comum, colocando-se a placa tampada com o fundo voltado para cima. Foram realizados 20 testes preliminares utilizando-se em paralelo a técnica convencional de fechamento e a técnica alternativa. A técnica mostrou-se econômica e de fácil execução, e a reprodutibilidade das leituras quando comparamos os dois métodos mostrou-se satisfatória. Nas placas em que se utilizou a Gelatina, novas leituras foram realizadas quinzenalmente durante 6 meses, e não se verificaram quaisquer alterações na morfologia celular nem no padrão de leitura.

**Unitermos:** sistema HLA; sorologia HLA; microlinfocitotoxicidade; tipagem HLA.

### Introdução

O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC<sup>a</sup>) é representado, na espécie humana, pelo sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (Sistema HLA<sup>b</sup>). Tal sistema antigênico é composto por glicoproteínas integrais expressas nas membranas citoplasmáticas de determinadas populações celulares, dividindo-se basicamente em moléculas de *classe I* (HLA A, B e C) encontradas

em praticamente todas as células nucleadas do organismo<sup>(1)</sup>, e moléculas de *classe II* (HLA DR, DQ e DP), com uma distribuição mais restrita – basicamente células imunocompetentes<sup>(2)</sup>.

<sup>a</sup>A sigla MHC vem da expressão em inglês Major Histocompatibility Complex, consagrada pelo uso também em português.

<sup>b</sup>A sigla HLA vem da expressão em inglês Human Leukocyte Antigen, consagrada pelo uso também em português.

<sup>1</sup>Pesquisador Científico do Laboratório de Imunogenética do DITRAN/INCA.

<sup>2</sup>Bióloga da Fundação Ary Frauzino.

<sup>3</sup>Farmacêutica do Laboratório de Histocompatibilidade do Departamento de Histologia e Embriologia/Instituto de Biologia/UERJ.

<sup>4</sup>Médico, Chefe do DITRAN/INCA.

As principais aplicações desse sistema são: estudos antropológicos<sup>(3)</sup>, investigação de paternidade<sup>(4)</sup>, associações HLA x doenças<sup>(5)</sup> e estudos de compatibilidade para transplante. Nesse último grupo destacam-se, especialmente: a) os transplantes de medula óssea, onde é sabido que o grau de compatibilidade HLA entre o paciente e seu doador é fator decisivo na pega e sobrevida do enxerto e na ocorrência e severidade da reação do enxerto-contrá-hospedeiro<sup>(6)</sup>, e b) os transplantes renais, onde é mandatória a realização, pré-transplante, de uma *prova cruzada* (ou *crossmatch*) para detectar a existência, no soro do receptor, de anticorpos pré-formados deletérios, dirigidos contra as moléculas HLA do doador<sup>(7)</sup>.

A existência do Sistema HLA é aceita desde a década de 50<sup>(8,9)</sup>. Os estudos para sua descrição evoluíram muito desde então<sup>(10,11)</sup>, mas um importante avanço metodológico surgiu ainda muito cedo, com a descrição de um teste de *microlinfocitotoxicidade* por Terasaki & McClelland em 1964<sup>(12)</sup>. Essa técnica básica, mesmo sofrendo ligeiras modificações posteriormente por outros autores<sup>(13)</sup>, vem sendo empregada rotineiramente em laboratórios de histocompatibilidade e imunogenética humanas. Na maioria dos estudos envolvendo as aplicações acima descritas, a sorologia HLA através da técnica de Terasaki pode ser aplicada. Trata-se de uma microtécnica, na qual células mononucleares obtidas de sangue periférico, portadoras das moléculas HLA, são utilizadas como alvo em reações de citotoxicidade dependente de complemento. As reações são desenvolvidas em microplacas específicas (chamadas *placas Terasaki*) com auxílio de micro-seringas especialmente desenvolvidas para esse fim, sendo a etapa final do método a cobertura da placa com lamínula de vidro 50 x 75 mm para posterior leitura ao microscópio (Foto 1a). Devido às características da placa e ao tipo de preparação utilizada, a leitura se dá necessariamente através de microscópio óptico de luz invertida com contraste de fase (Foto 1b).

O objetivo do presente trabalho é apresentar uma técnica de fechamento da placa Terasaki que permita a leitura em microscópio óptico comum. A técnica ora apresentada consiste num preparado tipo "gel" que é colocado sobre a placa Terasaki ao término da metodologia usual, o qual permite a inversão da placa sem prejuízo do material.

### **Materiais e métodos**

Foram desenvolvidos vários experimentos até a obtenção de uma solução líquida, hidrossolúvel, solidificável em curto espaço de tempo e sem re-

versão ao estado líquido em temperatura ambiente, com índice de refração compatível com a microscopia óptica comum, e que não interferisse de nenhuma forma nas reações sorológicas obtidas e tampouco na morfologia celular.

### **Preparo da gelatina**

A fórmula inicialmente testada foi obtida numa revisão das técnicas de fechamento definitivo de preparações histológicas. A fórmula descrita por Kaiser<sup>(14)</sup> foi considerada, dentre todas as testadas, a que mais se aproximou dos objetivos desejados. Entretanto, a fim de melhor adequá-la à nova aplicação proposta, foram introduzidas algumas modificações, resultando na fórmula da *gelatina de Kaiser modificada* descrita a seguir:

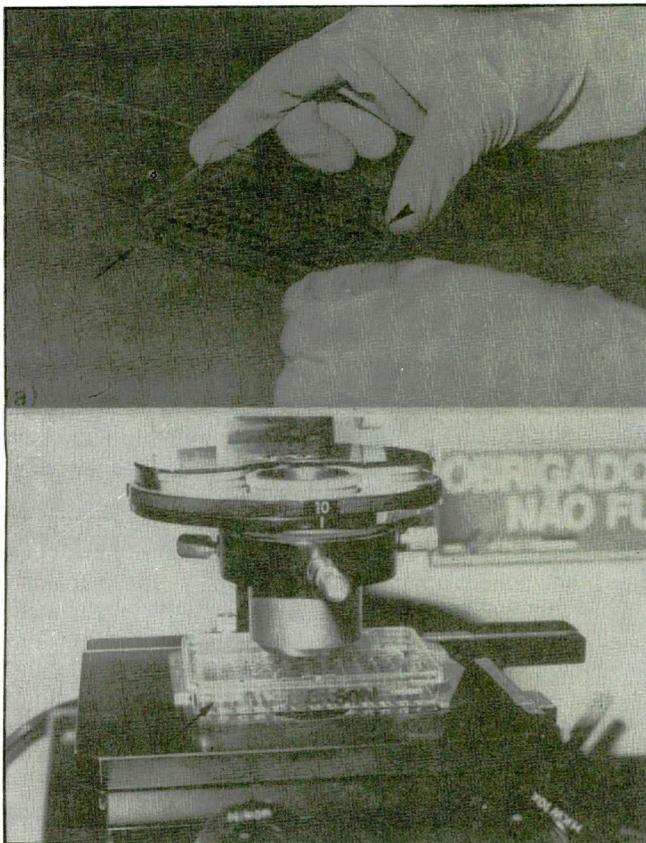
Gelatina comum em folha	0,8 g
Água destilada	12,0 ml
Glicerina	14,0 ml
Timol	0,8 g

O preparo consiste na dissolução prévia das folhas de gelatina em água destilada em banho-maria a 56°C por cerca de 10 minutos, com gentil homogeneização para evitar a formação de bolhas de ar. A glicerina e o timol são adicionados à preparação ainda no banho-maria, sob contínua homogeneização. A *gelatina de Kaiser modificada* pode ser conservada em frasco fechado em estufa a 37°C até o momento do uso.

### **Aplicação da gelatina de Kaiser modificada nas placas Terasaki**

O procedimento técnico de sorologia HLA é desenvolvido normalmente segundo descrito previamente<sup>(15)</sup>. Após coloração com eosina e fixação com formol neutro, a placa é deixada em repouso por cerca de 10-20 minutos para a completa sedimentação das células no fundo dos orifícios. A seguir, é levada ao congelador da geladeira por 5 minutos, tempo suficiente para a solidificação do óleo mineral contido na placa.

Ao ser retirada do congelador, a placa deve receber imediatamente a gelatina, que é retirada da estufa no exato momento do uso. A gelatina é dispensada na placa vagorosamente, pela borda da mesma, com auxílio de uma pipeta de 10 ml, devendo cobrir homogeneamente toda a placa (Foto 2a). A seguir, a preparação é deixada à tempe-



**Foto 1** – Metodologia clássica de fechamento e leitura das placas Terasaki. (a) Microplaca Terasaki (seta) recebendo a laminula de vidro para fechamento (cabeça de seta). (b) Posicionamento da microplaca Terasaki (seta) para leitura em microscópio de luz invertida.

ratura ambiente por cerca de 10 minutos, até que a preparação atinja o estado “gel”.

A leitura pode então ser feita normalmente em microscópio óptico comum, colocando-se a placa tampada na posição invertida, ou seja, com o fundo da mesma voltado para cima (Foto 2b).

### Testes em placas de tipagem e de *crossmatches*

Foram realizados 10 testes de tipagem HLA e 10 testes de *crossmatches*, utilizando-se em paralelo a técnica convencional de fechamento da placa e a técnica ora proposta. Nas placas em que se utilizou a *gelatina de Kaiser modificada*, novas leituras foram realizadas quinzenalmente durante 6 meses, para verificar possíveis alterações na morfologia celular e/ou no padrão de leitura.

### Resultados

A leitura das reações sorológicas nas placas Terasaki obedece a um padrão recomendado in-



**Foto 2** – Metodologia alternativa proposta para fechamento e leitura das microplacas Terasaki. (a) Colocação da gelatina sobre a microplaca Terasaki. (b) Posicionamento da microplaca para leitura em microscópio óptico comum. Notar a placa tampada (cabeça de seta), colocada com o fundo voltado para cima (seta).

ternacionalmente<sup>(15)</sup>. Esse padrão estabelece uma gradação para as reações, a saber: 1+ (reação negativa), 2+ (reação negativa duvidosa), 4+ (reação fracamente positiva), 6+ (reação positiva) e 8+ (reação fortemente positiva).

As leituras foram comparadas nos vinte testes com células mononucleares totais de sangue periférico utilizando-se simultaneamente as duas técnicas de fechamento. Não houve diferença significativa nas leituras realizadas por dois observadores independentes, e também não houve alteração na morfologia das células quando comparados os dois métodos. Todos os resultados foram mantidos inalterados até 6 meses após realização dos testes.

### Discussão

Nos testes preliminares realizados até o momento, a reprodutibilidade das leituras, quando comparamos o método tradicional (laminula de vidro e leitura em microscópio invertido) com o mé-

todo alternativo proposto (gelatina de Kaiser modificada e leitura em microscópio óptico comum), mostrou-se satisfatória.

A técnica alternativa apresentada resume-se na substituição do emprego de lamínula de vidro 50 x 75 mm sobre as placas Terasaki por um preparado que em temperatura ambiente atinge o estado gel e permite a leitura com a placa em posição invertida em microscópio óptico comum.

A técnica mostrou-se econômica, de fácil execução e, nos testes preliminares desenvolvidos até o momento, com reprodutibilidade satisfatória em relação à metodologia existente. Novos experimentos porém são necessários, para confirmar os resultados obtidos até o momento, e para testar esse preparado nos métodos que empregam subpopulações isoladas de sangue periférico (linfócitos T, linfócitos B e monócitos).

As principais vantagens do método são, além do baixo custo do produto em si e da não necessidade do microscópio invertido, a possibilidade de arquivamento da placa por pelo menos 4 meses (tempo testado até o momento) e a facilidade de transporte em longas distâncias, já que pelo método tradicional o conteúdo da placa, mesmo protegido por lamínula de vidro, tende a extravasar.

### Summary

*The HLA system consists in a group of cell membrane proteins: the HLA-A, B, C, DR, DQ and DP molecules. Among the main uses of this system we can find the family and random studies for bone marrow transplantation, as well as the cross-matches before kidney transplantations. An important methodological advance in the study of the HLA system arised very soon, with the development of a microlymphocytotoxicity technique, used until nowadays, in which the mononuclear blood cells bearing the HLA molecules are used as target for cytotoxicity reactions developed in specialized microtrays. The final step of the serological method consists to cover the tray with a glass cover slip and to read the reactions at an inverted light microscope. We present an alternative technique to close the tray, which permits the utilization of a common light microscope. In this proposed method, a gel (Kaiser's modified gelatin) is placed gently over the tray at the end of the usual technique, following eosin staining and formaline fixation. After that, the tray is placed, in inverted position, at a common light microscope and read in the same way as the usual method. Twenty preliminary tests were performed until now, with a very good reprodutibility in terms of reaction patterns; no mor-*

*phological alterations were seen in these tests, when compared with the conventional technique. The use of this gelatin proved to be economical, easy to perform and very reproducible. The trays covered with the gelatin were read again each two weeks for six months, and we did not find any difference in the reaction patterns as well as in the cell morphology.*

**Key words:** system; HLA serology; microlymphocytotoxicity; HLA typing.

### Referências bibliográficas

1. DAAR, A.S.; FUGGLE, S.U.; FABRE, J.W.; TING, A.; MORRIS, P.J. – The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38:287-292, 1984.
2. DAAR, A.S.; FUGGLE, S.U.; FABRE, J.W.; TING, A.; MORRIS, P.J. – The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38:293-298, 1984.
3. MARKOW, T.; HEDRICK, P.W.; ZUERLEIN, K. et al. – HLA polymorphism in the Havasupai: Evidence for balance selection. *Am J Hum Genet*, 53:943-952, 1993.
4. SALARU, N.N. – Evaluation of HLA in detection of non-parentage among known false trios. *J Forensic Sci*, 38(6):1478-81, 1993.
5. NEPOM, G.T. – HLA and type I diabetes. *Immunol Today*, 11:314, 1990.
6. ANASETTI, C.; BEATTY, P.G.; STORB, R. et al. – Effects of HLA incompatibility on GVHD, relapse and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol*, 29:110, 1990.
7. OLDFATHER, J.W.; ANDERSON, C.B.; PHELAN, D.C.; CROSS, D.; LUGER, A.; RODEY, G.E. – Prediction of crossmatch outcome in highly sensitized patients based on the identification of serum HLA antibodies. *Transplantation*, 42:267-270, 1986.
8. BRITTINGHAM, T.E.; CHAPLIN, H. JR. – Febrile transfusions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *Jama*, 165:819, 1957.
9. DAUSSET, J. – Iso-leuco anticorps. *Acta Haematol*, 20:156, 1958.
10. VAN ROOD, J.J.; VAN LEEUWEN, A. – Leukocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest*, 42:1382, 1963.
11. THORSBY, E.; SANDBERG, L.; LINDHOLM, A.; KISSMEYER-NEILSEN, F. – The HL-A system: evidence of a third sublocus. *Scand J Haematol*, 7:195, 1970.
12. TERASAKI, P.I.; MCCLELLAND, J.D. – Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204:998, 1964.
13. AMOS, D.B.; BASHIR, H.; BOYLE, W.; MACQUEEN, M.; TILIKAINEN, A. – A simple microcytotoxicity test. *Transplantation*, 7:220-222, 1969.
14. BEÇAK, W.; PAULETE-VANRELL, J. – Técnicas de citologia e histologia. 1ª ed. Rio de Janeiro. Nobel S/A, pp. 140, 1970.
15. HOPKINS, K.A. – The basic lymphocyte microcytotoxicity tests. In: Phelan DL, Mickelson EM, Noreen HS, Shroyer TW, Cluff DM, Nekaein A, eds. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> edition. Dallas Texas, IB1.1 – IB1.13, 1994.