

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**BEATRIZ CAMILY SANTOS ALVES**

**SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NA IDENTIFICAÇÃO DE  
ALELOS HLA: MAIS PRECISO E APRIMORADO**

**GOIÂNIA  
2026**

NOTA FINAL = 9,1

BEATRIZ CAMILY SANTOS ALVES

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NA IDENTIFICAÇÃO DE  
ALELOS HLA: MAIS PRECISO E APRIMORADO

Trabalho de conclusão de curso para  
obtenção do título de graduação em  
(nome do curso) apresentado à  
Universidade Paulista – UNIP.

Orientador(a): Prof. Me. Raphael Ladislau  
de Alcântara

**GOIÂNIA**  
**2026**

CIP - Catalogação na Publicação

Alves, Beatriz Camily Santos.

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NA  
IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS HLA: MAIS PRECISO E APRIMORADO /  
Beatriz Camily Santos Alves. – 2026.

38 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) apresentado ao  
Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Paulista, Goiânia , 2026.

Área de Concentração: Imunologia.

Orientador: Prof. Me. Raphael Ladislau Alcântara.

1. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO . 2. HLA . 3.  
Histocompatibilidade . 4. Transplante de Medula Óssea . I. Alcântara,  
Raphael Ladislau (orientador). II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Universidade Paulista  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

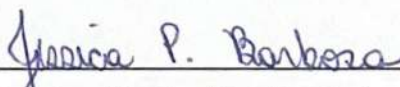
BEATRIZ CAMILY SANTOS ALVES

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NA IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS  
HLA: MAIS PRECISO E APRIMORADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Ciências da Saúde da  
Universidade Paulista, *Campus* Flamboyant,  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 03 / 06 / 26

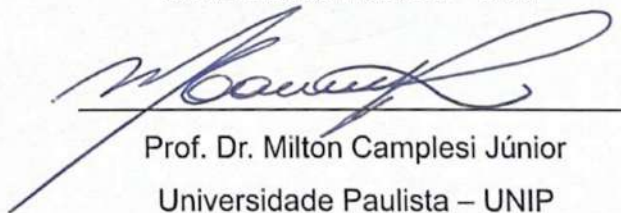
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Jéssica Pereira Barbosa  
Universidade Paulista - UNIP



Prof. Me. Raphael Ladislau de Alcantara  
Universidade Paulista - UNIP



Prof. Dr. Milton Camplesi Júnior  
Universidade Paulista – UNIP

Dedico este trabalho a minha mãe Mariene, que acreditou em meu potencial e fez tudo que podia e não podia para eu chegar aqui.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me sustentado até aqui, me dando força, proteção e coragem, pois não foram dias fáceis. Somente eu e Ele sabemos das noites mal dormidas, do medo enfrentado ao voltar para casa tarde da noite e de quantas vezes pensei em desistir. Ainda assim, Ele esteve comigo durante toda essa caminhada, me guardando e guiando em cada momento.

Agradeço aos meus pais por todo apoio e por sempre acreditarem no meu potencial. Ao meu pai, agradeço por cada incentivo, conselho e apoio ao longo dessa trajetória. Em especial, agradeço à minha mãe, que esteve ao meu lado durante as madrugadas de estudo, sendo meu maior exemplo de força, amor e superação. Tudo o que sou hoje devo, em grande parte, a ela.

Agradeço também às minhas amigas Kathleen, Larissa, Stefany e Graziely, que seguraram minha mão e não soltaram em nenhum momento. Foi um privilégio compartilhar esses quatro anos com vocês, repletos de desafios, aprendizados e memórias inesquecíveis.

À minha amiga Gabriela, deixo um agradecimento especial por ter compartilhado comigo muito mais do que os momentos da faculdade — compartilhamos até o pão de cada dia. Enfrentamos frio, ônibus lotados, cansaço e tantas dificuldades para chegar até aqui. E, sinceramente, passaria por tudo novamente se fosse ao seu lado, porque toda essa caminhada valeu a pena.

Agradeço especialmente às minhas amigas Maria Clara e Daniele, que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e fizeram parte dessa jornada tão importante.

Por fim, deixo meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte dessa trajetória, desde o começo até o fim, e também àqueles que passaram pela minha vida durante esse caminho. Cada pessoa teve sua importância nessa conquista. A todos vocês, os meus mais sinceros agradecimentos.

*"A defesa mais poderosa não é a que ataca, mas a que reconhece o perigo e se adapta."*

*Baseado em Charles Darwin*

## RESUMO

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é considerado uma das principais alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças hematológicas, imunológicas e oncológicas, como leucemias, linfomas e anemias aplásticas. O sucesso do procedimento está diretamente relacionado à compatibilidade imunológica entre doador e receptor, especialmente no sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), responsável pelo reconhecimento imunológico celular. Devido ao elevado polimorfismo dos genes HLA, a identificação de doadores totalmente compatíveis representa um dos principais desafios da histocompatibilidade em transplantes de medula óssea. Nesse contexto, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) surge como uma importante ferramenta tecnológica, proporcionando maior precisão e resolução na identificação de alelos HLA, inclusive variantes raras.

O presente estudo teve como objetivo analisar a utilização do Sequenciamento de Nova Geração na identificação de alelos HLA e sua contribuição para a compatibilidade em transplantes de células-tronco hematopoéticas. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, realizada nas bases de dados Google Acadêmico, PubMed e ScienceDirect, utilizando descritores relacionados ao NGS e à compatibilidade de medula óssea, em português e inglês. Foram incluídos estudos publicados a partir de 2021, sendo selecionados estudos observacionais após análise criteriosa dos títulos, resumos e textos completos.

Os resultados demonstraram que o NGS apresenta elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de tipagem de alta resolução, permitindo identificar novos alelos HLA e ampliar as possibilidades de compatibilidade entre doadores e receptores. Além disso, os estudos evidenciaram que a utilização dessa tecnologia contribui para o enriquecimento dos bancos de dados genéticos e para melhor representação da diversidade populacional, especialmente em grupos geneticamente miscigenados e migratórios. Entretanto, ainda existem limitações relacionadas aos custos elevados, necessidade de infraestrutura tecnológica especializada, padronização metodológica e processamento bioinformático dos dados.

Conclui-se que o Sequenciamento de Nova Geração representa um avanço significativo na imunogenética e na histocompatibilidade aplicada aos transplantes de medula óssea, contribuindo para maior segurança, precisão diagnóstica e melhores desfechos clínicos. Dessa forma, o investimento em inovação tecnológica, capacitação profissional e ampliação dos registros de doadores torna-se fundamental para consolidar a utilização do NGS na prática clínica.

Palavras-chave: Sequenciamento de Nova Geração; HLA; Histocompatibilidade; Transplante de Medula Óssea.

## **ABSTRACT**

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is considered one of the main therapeutic alternatives for the treatment of hematological, immunological, and oncological diseases, such as leukemias, lymphomas, and aplastic anemias. The success of the procedure is directly related to the immunological compatibility between donor and recipient, especially in the human leukocyte antigen (HLA) system, responsible for cellular immunological recognition. Due to the high polymorphism of HLA genes, the identification of fully compatible donors represents one of the main challenges of histocompatibility in bone marrow transplants. In this context, Next-Generation Sequencing (NGS) emerges as an important technological tool, providing greater precision and resolution in the identification of HLA alleles, including rare variants.

This study aimed to analyze the use of Next-Generation Sequencing in the identification of HLA alleles and its contribution to compatibility in hematopoietic stem cell transplants. This is an integrative literature review, conducted in the Google Scholar, PubMed, and ScienceDirect databases, using descriptors related to NGS and bone marrow compatibility, in Portuguese and English. Studies published from 2021 onwards were included, with clinical trials and observational studies selected after careful analysis of titles, abstracts, and full texts.

The results demonstrated that NGS has high sensitivity, specificity, and high-resolution typing capabilities, allowing the identification of new HLA alleles and expanding the possibilities of compatibility between donors and recipients. In addition, the studies showed that the use of this technology contributes to the enrichment of genetic databases and to a better representation of population diversity, especially in genetically mixed and migratory groups. However, there are still limitations related to high costs, the need for specialized technological infrastructure, methodological standardization, and bioinformatic data processing.

In conclusion, Next-Generation Sequencing represents a significant advancement in immunogenetics and histocompatibility applied to bone marrow transplantation, contributing to greater safety, diagnostic accuracy, and improved clinical outcomes. Therefore, investment in technological innovation, professional training, and expansion of donor registries becomes fundamental to consolidating the use of NGS in clinical practice.

Keywords: Next-Generation Sequencing; HLA; Histocompatibility; Bone Marrow Transplantation.

## SUMÁRIO

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                | <b>13</b> |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                                                       | <b>14</b> |
| 2.1 Transplantes de células-tronco hematopoiéticas.....                                 | 14        |
| 2.1.1 Contexto histórico.....                                                           | 14        |
| 2.1.2 Finalidade.....                                                                   | 15        |
| 2.1.3 Compatibilidade imunológica no transplante de células-tronco hematopoéticas ..... | 15        |
| 2.2 Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA).....                               | 16        |
| 2.2.1 Definição e localização genética.....                                             | 16        |
| 2.2.2 Funções imunológicas.....                                                         | 16        |
| 2.2.3 CLASSE HLA I (A, B, C).....                                                       | 17        |
| 2.2.4 CLASSE II (DR, DP e DQ).....                                                      | 17        |
| 2.2.5 Impacto de HLA em TMO.....                                                        | 17        |
| 2.2.6 Limitações Gerais.....                                                            | 18        |
| 2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) aplicado ao HLA.....                           | 18        |
| 2.3.1 Sequenciamento de DNA.....                                                        | 18        |
| 2.3.2 Princípio de NGS.....                                                             | 20        |
| 2.4 Principais plataformas de NGS.....                                                  | 21        |
| 2.4.1 Illumina (MiSeq, NextSeq, NovaSeq).....                                           | 21        |
| 2.4.2 Ion Torrent (Ion S5, Ion PGM).....                                                | 22        |
| 2.4.3 PacBio (Sequel IIe, RS II).....                                                   | 23        |
| 2.4.4 Oxford Nanopore (MinION, PromethION).....                                         | 24        |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>                                                               | <b>26</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                    | <b>28</b> |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                      | <b>32</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                 | <b>33</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) constitui uma das terapias mais eficazes no tratamento de doenças hematológicas, imunológicas e oncológicas. A técnica, que substitui a medula óssea comprometida por células saudáveis, tem alcançado avanços significativos em suas taxas de sucesso devido à evolução nas práticas clínicas e laboratoriais, especialmente na seleção de doadores e no manejo imunológico. Além disso, o TCTH representa uma importante alternativa terapêutica para pacientes com doenças como leucemias, linfomas, mielodisplasias e anemias aplásticas severas, proporcionando maiores chances de remissão e sobrevida. O sucesso do procedimento depende de diversos fatores, incluindo a condição clínica do paciente, o tipo de transplante realizado e a compatibilidade imunológica entre doador e receptor. Nesse contexto, os avanços tecnológicos têm desempenhado papel fundamental na redução de complicações pós-transplante e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes transplantados(KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2023).

A compatibilidade no sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA – Human Leukocyte Antigen) é determinante para o sucesso do transplante, pois regula o reconhecimento imunológico entre doador e receptor. Diferenças nos alelos HLA podem resultar em complicações graves, como a Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH), o que reforça a importância da tipagem de alta resolução na seleção de doadores (ROCHA et al., 2023; LEE et al., 2024).

O sistema HLA é considerado altamente polimórfico, apresentando grande variabilidade genética entre os indivíduos, o que dificulta a identificação de doadores totalmente compatíveis, especialmente em populações geneticamente miscigenadas. Dessa forma, a busca por compatibilidade adequada torna-se um dos principais desafios dos bancos de doadores de medula óssea. A correta identificação dos alelos HLA reduz significativamente os riscos de rejeição do enxerto, falha de enxertia e complicações imunológicas, contribuindo diretamente para melhores desfechos clínicos após o transplante(WRIGHT et al., 2023; CRANE et al., 2024).

Com o avanço do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), a análise genômica tornou-se mais precisa e abrangente, permitindo identificar variantes raras e ampliar a compatibilidade HLA entre doador e receptor. Essa tecnologia

revolucionou os métodos de histocompatibilidade, otimizando os resultados clínicos e contribuindo para uma abordagem mais personalizada e segura nos transplantes de medula óssea (AKINTUNDE et al., 2023).

O NGS possibilita a realização de tipagens de alta resolução com maior sensibilidade e especificidade quando comparado às metodologias convencionais, permitindo a detecção de novos alelos e variantes genéticas relevantes para a compatibilidade imunológica. Além disso, a tecnologia apresenta capacidade de processamento simultâneo de múltiplas amostras, reduzindo o tempo de análise e aumentando a eficiência dos laboratórios especializados em histocompatibilidade. Esses avanços favorecem não apenas a seleção mais precisa de doadores, mas também contribuem para o desenvolvimento da medicina personalizada aplicada aos transplantes (LEE et al., 2024; CRANE et al., 2024).

Desse modo, a escolha deste tema justifica-se pela importância de compreender o papel do sistema HLA e das tecnologias de alta resolução, como o NGS, no processo de seleção de doadores para o transplante de células-tronco hematopoiéticas. Além disso, avaliar como o Sequenciamento de Nova Geração pode aprimorar a identificação de alelos HLA nos transplantes de medula óssea torna-se essencial diante da crescente necessidade de métodos mais precisos e seguros na prática clínica. A ampliação do conhecimento sobre essas tecnologias pode contribuir para a otimização dos bancos de doadores, aumento das taxas de compatibilidade e redução de complicações imunológicas pós-transplante. Dessa forma, o presente estudo busca evidenciar a relevância do NGS na imunogenética e sua contribuição para a melhoria dos resultados terapêuticos em pacientes submetidos ao TCTH.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Transplantes de células-tronco hematopoiéticas**

#### **2.1.1 Contexto histórico**

Em meados da década de 50 foi explorado pela primeira vez o transplante de células hematopoiéticas em humanos após observações em modelos experimentais

em camundongos onde a infusão de componentes saudáveis na medula óssea imunossuprimida auxiliaria no prognóstico do receptor (KHADDOUR, K.; HANA, C. K.; MEWAWALLA, P.2023).

Historicamente, a medula óssea foi a primeira e principal fonte de células tronco hematopoiéticas utilizadas em transplantes desde o início da década de 1960 (GORIN et al., 1977). Posteriormente, em 1986, o êxito do primeiro transplante de sangue de cordão umbilical não aparentado em uma criança demonstrou a viabilidade do sangue de cordão umbilical como uma fonte alternativa de células-tronco em contextos específicos (GLUCKMAN et al., 1997).

Já em 1994, com a comprovação de que o sangue periférico, mobilizado por citocinas como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), mais recentemente, pelo plerixafor, poderia ser utilizado de forma equivalente à medula óssea, observou-se um crescimento expressivo no uso dessa fonte celular. Atualmente, os transplantes realizados com sangue periférico representam cerca de 65% dos haploidênticos, 90% dos alogênicos e praticamente 100% dos autólogos (PASSWEG et al., 2021).

### **2.1.2 Finalidade**

No transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), as células da medula óssea doentes e o sistema imunológico do paciente são substituídos por células saudáveis do doador. Após quimio e/ou radioterapia, o enxerto pode eliminar células tumorais residuais por meio do efeito enxerto versus tumor. O procedimento depende de um doador compatível e tem como principal finalidade curar doenças hematológicas ou malignidades (ROCHA et al., 2023).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas pode ser autólogo (o que significa que as células-tronco são coletadas do receptor) ou alogênicas (o que significa que as células vêm de outro indivíduo ou de uma ou mais unidades de sangue do cordão umbilical) (BAZINET, A.; POPRADÍ, G. 2019).

### **2.1.3 Compatibilidade imunológica no transplante de células-tronco hematopoéticas**

A histocompatibilidade é de suma importância quando se trata do sucesso de qualquer transplante, em especial o de Medula Óssea pois desempenha uma

resposta imunológica do receptor e visa melhoria do tratamento(BAZINET;POPRADÍ, 2019).

O principal complexo de histocompatibilidade em humanos é o Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) , no qual é controlado por genes do cromossomo 6. Sua herança se dá de forma autossômica e codominante. De maneira que, cada genitor possui dois cromossomos 6 diferentes, logo quatro combinações diferentes de haplótipos são possíveis para seus descendentes (ROCHA. et al., 2023).

Esse modelo de herança é relevante na busca de um doador compatível para TCTH, uma das complicações que podem suceder em um transplante destaca-se a Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) condição caracterizada pela ativação dos linfócitos T do doador no corpo do receptor caracteriza por febre, náuseas, vômitos, diarreia e distúrbios no fígado, além de agravar outros possíveis achados, como alterações oculares e complicações nos sistemas respiratório e digestório (ROCHA, et al.2023).

Assim, com base na análise da literatura, torna-se evidente a importância das medidas de pesquisa realizadas antes do TMO, o qual para que seja bem realizado, é necessário, entre outros fatores, que exista compatibilidade doador-receptor para moléculas codificadas pelos genes HLA relacionados às classes I e II. Na atual rotina laboratorial dos exames de histocompatibilidade para transplante são analisados os locus HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (ROCHA, et al.2023).

## **2.2 Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA)**

### **2.2.1 Definição e localização genética**

Os genes do CPH (MHC - “Major Histocompatibility Complex”), na espécie humana, recebem a denominação de sistema HLA (Human Leukocyte Antigen). Sua atual localização está no braço curto do cromossomo 6 agrupados em três regiões e subdivididos em classes I, II e III (Carreras et al., 2019). Tais células desempenham papel crucial no funcionamento sistema imunológico fazendo reconhecimento ou não para antígenos estranhos ou células imune, ao se tratar de transplantes duas classes destes alelos se destacam sendo os alelos da classe I pois são polimórficas (CARRERAS et al., 2019).

### **2.2.2 Funções imunológicas**

O complexo principal de histocompatibilidade (HLA) de classe II desempenha papel central na ativação da resposta imune adaptativa, estando restrito principalmente a células apresentadoras de antígenos profissionais, como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Essas moléculas associam-se a peptídeos exógenos derivados da degradação de proteínas captadas do meio extracelular e, em seguida, apresentam esses fragmentos na superfície celular aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. O reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T auxiliares desencadeia a produção de citocinas, estimulando tanto a resposta imune celular quanto a humoral. Dessa forma, o HLA classe II é fundamental para a coordenação da imunidade adaptativa, promovendo a comunicação entre diferentes células do sistema imune e potencializando a defesa contra patógenos extracelulares (ALVES et al, 2006).

### **2.2.3 CLASSE HLA I (A, B, C)**

Moléculas de classe I se apresenta para linfócitos T citotóxicos (CD8), sendo presentes basicamente em todas as células nucleadas do organismo; são glicoproteínas que atravessam a membrana celular, com vasto domínio citoplasmático (COOH) , região transmembrânica e 3 domínios externos (NH<sub>2</sub>) (CARRERAS et al., 2019).

### **2.2.4 CLASSE II (DR, DP e DQ)**

Na membrana de linfócitos B, estão presente as moléculas de Classe II sendo monócitos, macrófagos, linfócitos T ativados, células endoteliais de capilares e melanomas e algumas células leucêmicas(Carreras et al., 2019). Possuem uma constituição de duas cadeias polipeptídicas, (alpha) de 34.000 daltons, (beta) de 29000 daltons, associados não covalentemente, ambas polimórficas , cada uma com dois domínios externos (CARRERAS et al., 2019).

### **2.2.5 Impacto de HLA em TMO**

A compatibilidade do sistema HLA exerce papel fundamental no sucesso do transplante de medula óssea, sendo determinante para o reconhecimento imunológico entre doador e receptor. Diferenças nos alelos HLA podem desencadear respostas imunológicas adversas, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a rejeição do enxerto, comprometendo a sobrevida e a recuperação pós-transplante. A tipagem HLA de alta resolução, obtida por técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), possibilita a identificação precisa dos alelos e a seleção de doadores mais compatíveis, reduzindo o risco de complicações

imunológicas. Assim, a análise detalhada do HLA tornou-se essencial na prática clínica, contribuindo para maior segurança, eficácia e prognóstico favorável nos procedimentos de transplante de medula óssea (AKINTUNDE et al., 2023).

#### **2.2.6 Limitações Gerais**

Apesar de o sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) exercer um papel crucial na compatibilidade entre doador e receptor em transplantes de medula óssea, diversas limitações operacionais e clínicas da tipagem HLA tradicional ainda impactam os desfechos dos procedimentos. A elevada polimorfia dos loci HLA torna difícil encontrar correspondências perfeitas entre doador e receptor, principalmente quando se recorre a doadores não aparentados, o que reduz as chances de compatibilidade ideal (LEE et al., 2007; SPELLMAN et al., 2012).

Os métodos convencionais como tipagem sorológica ou de baixa resolução frequentemente não conseguem detectar incompatibilidade ou disparidades alélicas ocultas, que podem desencadear eventos adversos como rejeição do enxerto ou a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (DEBENHAM & KIM, 2022).

Além disso, a disponibilidade de doadores completamente compatíveis permanece um desafio, sobretudo em populações com alta diversidade genética, o que pode aumentar o tempo de espera pelo transplante e elevar os riscos relacionados ao procedimento (GRAGERT et al., 2014; SU, 2021).

Outro aspecto limitante refere-se à heterogeneidade metodológica entre laboratórios, que nem sempre realizam tipagem de alta resolução ou consideram todos os loci relevantes (por exemplo, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DP), comprometendo a precisão da correspondência e potencialmente o prognóstico clínico (TAIT, 2023).

Mesmo quando há correspondência HLA adequada, existem fatores não-HLA como antígenos menores, compatibilidade de resposta imune inata ou perfil das células natural killer que não são capturados pelos testes tradicionais, mas que influenciam o sucesso do transplante (FRONTIERS, 2022).

Essas limitações evidenciam a necessidade de técnicas mais refinadas e abrangentes (como a tipagem de alta resolução por sequenciamento) e de uma abordagem mais holística no processo de seleção de doadores e avaliação de compatibilidade.

## **2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) aplicado ao HLA**

### **2.3.1 Sequenciamento de DNA**

O sequenciamento de DNA é uma técnica fundamental da biologia molecular que visa identificar a ordem exata dos nucleotídeos adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) que compõem uma molécula de DNA. Essa informação genética é essencial para compreender a estrutura e o funcionamento dos genes, permitindo detectar mutações, polimorfismos e variantes alélicas que podem influenciar processos fisiológicos e patológicos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; COPEC, 2013).

O processo inicia-se com a extração e purificação do DNA, geralmente a partir de sangue periférico, células da medula óssea ou tecidos biológicos. Em seguida, o DNA é fragmentado em pequenas porções que são amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de gerar quantidade suficiente para análise (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; COPEC, 2013).

Nos métodos clássicos, como o método de Sanger, a síntese da nova fita de DNA é interrompida de forma controlada por nucleotídeos modificados (*dideoxynucleotídeos*), permitindo a leitura da sequência a partir da diferença de tamanho dos fragmentos gerados. Essa leitura era realizada por eletroforese capilar e detecção fluorescente, identificando cada base conforme sua marcação (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Com o avanço tecnológico, surgiram as plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS – Next Generation Sequencing), que introduziram o conceito de sequenciamento massivo e paralelo. Nessa metodologia, milhões de fragmentos de DNA são sequenciados simultaneamente em um mesmo ensaio, produzindo um volume muito maior de dados em menor tempo e custo. O processo envolve a preparação da biblioteca genômica envolve inicialmente a fragmentação do DNA e a adição de adaptadores específicos que permitem sua fixação e posterior amplificação. Em seguida, ocorre a amplificação em matriz sólida ou em microesferas, etapa fundamental para gerar múltiplas cópias de cada fragmento e garantir um sinal robusto durante a leitura. Por fim, o sequenciamento por síntese é realizado mediante a incorporação sequencial de nucleotídeos marcados com fluoróforos, cuja emissão é detectada a cada ciclo, possibilitando a identificação precisa da ordem das bases no material genético (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

No contexto do Transplante de Medula Óssea (TMO) ou Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) o sequenciamento de DNA possui papel essencial, especialmente na tipagem do sistema HLA (Human Leukocyte Antigen). Os genes do complexo HLA, localizados no braço curto do cromossomo 6, são altamente polimórficos e determinam a compatibilidade imunológica entre doador e receptor. A correta identificação desses alelos é fundamental para reduzir o risco de rejeição do enxerto e da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH). As metodologias tradicionais de tipagem, como sorologia e PCR-SSP, foram progressivamente substituídas por técnicas baseadas em NGS, que permitem a análise de múltiplos loci HLA com resolução alélica elevada, detectando diferenças até em variações de um único nucleotídeo (SNPs) (CROCCHIOLO; ROMBOLÀ, 2023). Essa precisão aprimorada tem contribuído diretamente para aumentar as taxas de sucesso nos transplantes alogênicos, reduzindo complicações imunológicas e ampliando o número de doadores compatíveis em registros internacionais (CROCCHIOLO; ROMBOLÀ, 2023).

Além disso, o avanço das tecnologias de NGS permitiu não apenas maior precisão na identificação de alelos HLA, mas também maior rapidez na análise de grandes volumes de amostras, tornando os processos de tipagem mais eficientes e acessíveis para centros de transplante e bancos de doadores. A elevada sensibilidade dessas plataformas possibilita a detecção de variantes raras e ambiguidades genéticas que frequentemente não eram identificadas por metodologias convencionais, contribuindo para uma seleção mais segura e compatível entre doador e receptor. Dessa forma, o sequenciamento de nova geração consolidou-se como uma ferramenta indispensável na imunogenética moderna e no aprimoramento dos resultados clínicos em transplantes hematopoiéticos. Nesse cenário, diferentes plataformas de NGS foram desenvolvidas, cada uma apresentando particularidades metodológicas, vantagens e limitações específicas.

### **2.3.2 Princípio de NGS**

As metodologias de sequenciamento de DNA passaram por avanços expressivos nas últimas duas décadas, sobretudo com o desenvolvimento do Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing – NGS). Essa tecnologia transformou o panorama da pesquisa biomédica e das aplicações

clínicas, tornando-se uma ferramenta robusta, capaz de analisar, de forma simultânea, milhões de fragmentos de DNA, o que confere maior rapidez, sensibilidade e custo-efetividade ao processo (SATAM et al., 2023).

O NGS abrange diferentes estratégias, baseadas na síntese de novas fitas de DNA a partir da incorporação de nucleotídeos, possibilitando a identificação precisa de sequências de interesse. Entre suas aplicações destacam-se o sequenciamento do genoma completo (Whole Genome Sequencing – WGS), do exoma completo (Whole Exome Sequencing – WES), de painéis multigênicos e o sequenciamento direcionado (targeted sequencing), que inclui o uso de amplicons amplificados por PCR (AKINTUNDE et al., 2023).

No contexto da histocompatibilidade, o NGS tem se mostrado particularmente relevante para a tipagem de alelos do sistema HLA (Human Leukocyte Antigen), fundamental para a seleção de doadores em transplantes de medula óssea. O sequenciamento de amplicons com alta cobertura, por exemplo, permite a caracterização de alelos em nível de alta resolução, reduz ambiguidades na interpretação de variantes e possibilita a detecção de novos alelos ainda não descritos em bancos de dados de referência. Essa maior precisão na tipagem contribui para a escolha de doadores mais compatíveis, reduzindo o risco de complicações como a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH) e aumentando as taxas de sobrevida pós-transplante (SATAM et al., 2023).

## **2.4 Principais plataformas de NGS**

### **2.4.1 Illumina (MiSeq, NextSeq, NovaSeq)**

A plataforma Illumina constitui uma das tecnologias mais consolidadas e amplamente utilizadas no campo do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), especialmente em aplicações voltadas à genotipagem de alta resolução do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Seu princípio baseia-se no sequenciamento por síntese (Sequencing by Synthesis), no qual nucleotídeos marcados com fluoróforos e dotados de terminadores reversíveis são incorporados à cadeia de DNA durante a síntese. A emissão de fluorescência, capturada em cada ciclo, permite a determinação precisa da sequência de bases de milhões de fragmentos simultaneamente (ILLUMINA, 2024).

O fluxo de trabalho inicia-se com a preparação da biblioteca genômica, etapa

em que o DNA é fragmentado, adaptadores e índices são adicionados e as amostras são preparadas para o sequenciamento. Esses fragmentos são então hibridizados à superfície do flow cell, onde ocorre a amplificação por ponte (bridge amplification), resultando na formação de clusters clonais que servem de molde para o processo de leitura (GOODWIN; MCPHERSON; McCOMBIE, 2016).

Durante o sequenciamento por síntese, a incorporação sequencial dos nucleotídeos é monitorada por sistemas ópticos de alta precisão, possibilitando a identificação da base adicionada em cada ciclo (KIRCHER; KELSO, 2010).

No contexto da compatibilidade HLA, o uso da plataforma Illumina representa um avanço significativo em relação aos métodos convencionais, como a PCR-SSP e a PCR-SSO. O NGS permite a análise em nível alélico, abrangendo os loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DPB1, o que possibilita uma tipagem mais precisa e detalhada, reduzindo ambiguidades e aumentando a confiabilidade na seleção de doadores para transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Essa precisão é essencial para minimizar reações imunológicas indesejadas, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), e para otimizar o sucesso do transplante (ROCHA et al., 2023).

Além da alta acurácia e sensibilidade, a tecnologia Illumina apresenta vantagens como a multiplexagem de amostras, reduzindo o custo por análise, e a padronização do fluxo de trabalho, o que facilita sua aplicação em ambientes clínicos e laboratoriais. No entanto, o método também apresenta desafios, como o curto comprimento das leituras, que pode dificultar a resolução de regiões altamente polimórficas, e a necessidade de infraestrutura computacional robusta para o tratamento e armazenamento dos dados gerados (GOODWIN; MCPHERSON; McCOMBIE, 2016).

#### **2.4.2 Ion Torrent (Ion S5, Ion PGM)**

A plataforma Ion Torrent, desenvolvida pela Thermo Fisher Scientific, é uma das principais tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (Next-Generation Sequencing – NGS), destacando-se por empregar um princípio inovador de detecção iônica, que dispensa o uso de marcadores fluorescentes. Diferentemente de métodos baseados em detecção óptica, como o da Illumina, o Ion Torrent identifica as bases incorporadas durante a síntese do DNA por meio da variação de

pH gerada pela liberação de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) quando ocorre a adição de um nucleotídeo complementar à cadeia molde (ROTHBERG et al., 2011).

O processo inicia-se com a preparação da biblioteca genômica, onde o DNA é fragmentado, adaptadores são adicionados e as amostras são amplificadas por emulsão PCR (emPCR) sobre microesferas. Em seguida, essas esferas contendo fragmentos amplificados são depositadas nos poços de um semiconductor chip, no qual ocorre o sequenciamento por síntese. Cada vez que um nucleotídeo é incorporado, o sistema detecta a alteração de carga elétrica resultante da liberação de prótons, que é convertida em um sinal digital, sem necessidade de câmeras ou lasers (METZKER, 2010).

No contexto da tipagem HLA, o Ion Torrent oferece alta resolução alélica e capacidade para identificar múltiplos loci simultaneamente, como HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 e HLA-DQB1, permitindo uma caracterização mais precisa e detalhada dos alelos envolvidos na compatibilidade entre doador e receptor. Essa característica é de extrema relevância em procedimentos de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), nos quais pequenas diferenças na sequência dos alelos HLA podem impactar diretamente na ocorrência de rejeição do enxerto ou doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (ROCHA et al., 2023).

Entre as principais vantagens da plataforma Ion Torrent, destacam-se a rapidez na obtenção dos resultados, o baixo custo operacional, e a simplicidade do sistema de detecção, que reduz o tempo de análise e a necessidade de equipamentos ópticos complexos. Além disso, o Ion Torrent permite diferentes configurações de chips, como Ion 520/530/540, que variam conforme a capacidade de leitura e a profundidade de cobertura desejada (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2024).

No entanto, o método apresenta algumas limitações técnicas, como a sensibilidade a erros em regiões homopoliméricas (sequências com repetições consecutivas da mesma base), que podem afetar a precisão do sequenciamento. Ainda assim, a confiabilidade dos dados e a capacidade de gerar leituras curtas com alta cobertura tornam a plataforma Ion Torrent uma ferramenta robusta e eficiente para análises genéticas clínicas e laboratoriais, especialmente em laboratórios de histocompatibilidade e bancos de sangue que realizam a genotipagem HLA de alta resolução (Rothberg et al., 2011; Metzker, 2010).

Dessa forma, a tecnologia Ion Torrent consolidou-se como uma alternativa relevante dentro do sequenciamento de nova geração, principalmente pela combinação entre agilidade, sensibilidade analítica e aplicabilidade clínica. Sua utilização contribui significativamente para a ampliação da precisão diagnóstica na tipagem HLA e para a melhoria da seleção de doadores compatíveis em transplantes hematopoiéticos. Apesar das limitações relacionadas às regiões homopoliméricas, os avanços contínuos na bioinformática e nos protocolos de sequenciamento têm minimizado essas falhas e ampliado a confiabilidade dos resultados obtidos. Nesse cenário, o desenvolvimento de novas plataformas de sequenciamento vem proporcionando métodos cada vez mais eficientes, com maior comprimento de leitura e resolução genômica aprimorada.

#### **2.4.3 PacBio (Sequel IIe, RS II)**

A plataforma PacBio (*Pacific Biosciences*) é uma tecnologia de Sequenciamento de Terceira Geração, capaz de gerar leituras de DNA extremamente longas com alta precisão. Seu método baseia-se no princípio do Single Molecule Real-Time Sequencing (SMRT), que permite o monitoramento em tempo real da síntese de uma molécula individual de DNA, sem necessidade de amplificação prévia. Essa característica diferencia a PacBio das plataformas de segunda geração, como Illumina e Ion Torrent, que dependem da amplificação por PCR e geram leituras curtas (EID et al., 2019).

O processo utiliza células de observação chamadas Zero-Mode Waveguides (ZMWs), que confinam o volume de reação a escalas nanométricas, permitindo a detecção da fluorescência emitida pela DNA polimerase à medida que incorpora nucleotídeos marcados com fluoróforos distintos. Cada base adicionada é registrada em tempo real, produzindo leituras contínuas de dezenas de milhares de pares de base (RHOADS; AU, 2015). Essa capacidade de gerar leituras longas (long reads) é essencial para resolver regiões complexas, como repetições, inserções, deleções e polimorfismos estruturais características frequentes nos loci HLA.

No contexto da tipagem HLA, a PacBio tem se destacado por oferecer resolução alélica completa, abrangendo os seis loci mais relevantes para o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DPB1 com capacidade de leitura contínua que cobre os genes

inteiros, incluindo regiões exônicas e intrônicas. Isso elimina ambiguidades comuns nos métodos de segunda geração e possibilita a caracterização precisa de haplótipos completos, fator determinante para o sucesso do transplante e para a redução do risco de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (MARTIN et al., 2022).

Entre as principais vantagens da tecnologia PacBio, destacam-se a alta fidelidade das leituras (HiFi reads), a capacidade de detecção de variantes estruturais e a eliminação de erros gerados por amplificação. O método HiFi SMRT Sequencing, introduzido nas plataformas Sequel II e, combina leituras longas (10–25 kb) com taxas de erro inferiores a 1%, superando limitações históricas de precisão que afetavam as primeiras versões da tecnologia (PACIFIC BIOSCIENCES, 2024).

Apesar de sua eficiência, a PacBio apresenta custos mais elevados por corrida e menor rendimento de dados quando comparada a tecnologias de alto throughput, como a Illumina. Contudo, para aplicações que exigem resolução completa e análise de variantes complexas, como a tipagem HLA de alta resolução, seu desempenho é amplamente superior. Dessa forma, a PacBio representa uma ferramenta de referência em genotipagem de loci altamente polimórficos, consolidando-se como uma tecnologia de grande relevância para a medicina personalizada, transplantes e estudos de imunogenética (EID et al., 2019; RHOADS; AU, 2015).

Dessa maneira, a plataforma PacBio tornou-se uma das principais tecnologias aplicadas à tipagem HLA de alta resolução, especialmente em situações que demandam análise genômica detalhada e identificação precisa de variantes complexas. Sua capacidade de gerar leituras longas e contínuas contribui significativamente para a redução de ambiguidades alélicas e para o aprimoramento da compatibilidade entre doadores e receptores em transplantes hematopoiéticos. Embora o alto custo e o menor rendimento ainda representem limitações para sua ampla implementação em alguns laboratórios, os avanços recentes na tecnologia SMRT e nas leituras HiFi têm ampliado sua aplicabilidade clínica e científica. Nesse contexto, outras plataformas de terceira geração também vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de oferecer maior velocidade, portabilidade e eficiência no sequenciamento genético.

#### **2.4.4 Oxford Nanopore (MinION, PromethION)**

A plataforma Oxford Nanopore Technologies (ONT) representa uma das abordagens mais inovadoras no campo do Sequenciamento de Terceira Geração, caracterizando-se pela capacidade de ler moléculas de DNA ou RNA em tempo real, sem necessidade de amplificação ou marcação por fluorescência. Seu princípio baseia-se na passagem de moléculas de ácido nucleico por nanoporos biológicos embutidos em uma membrana sintética. À medida que cada nucleotídeo atravessa o poro, ocorre uma alteração específica no fluxo iônico detectado por sensores eletrônicos, permitindo a identificação direta da sequência de bases em tempo real (JAIN et al., 2016).

O processo de sequenciamento na plataforma ONT inicia-se com a preparação mínima da biblioteca, onde adaptadores são ligados às extremidades do DNA. A molécula é então guiada por uma helicase que controla sua passagem pelo nanoporo, enquanto um sistema de detecção de corrente elétrica registra variações que correspondem às diferentes bases nitrogenadas. Essa tecnologia é implementada em dispositivos de diferentes capacidades, como o MinION, GridION e PromethION, que variam em rendimento e número de nanoporos ativos (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES, 2024).

A principal vantagem da Oxford Nanopore é sua habilidade de gerar leituras ultralongas (ultra-long reads), que podem ultrapassar centenas de quilobases, possibilitando o sequenciamento completo de genes complexos, como os do sistema HLA. Essa característica é especialmente útil na tipagem HLA de alta resolução, pois permite abranger tanto regiões exônicas quanto intrônicas e identificar haplótipos completos sem ambiguidades — fator essencial para o sucesso dos transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (ROCHA et al., 2023).

Além disso, a plataforma ONT oferece portabilidade e rapidez na obtenção de resultados, permitindo análises em campo e em tempo real, com custo operacional reduzido. Em estudos comparativos, o sequenciamento por nanoporos demonstrou excelente correlação com métodos de segunda geração, sendo eficaz na identificação de alelos de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 e HLA-DQB1, com alta cobertura e fidelidade crescente à medida que os algoritmos de correção de erro evoluem (LIPPERT et al., 2021).

Entretanto, a tecnologia ainda enfrenta limitações relacionadas à precisão bruta de leitura, que tende a ser inferior à de plataformas ópticas, como a Illumina.

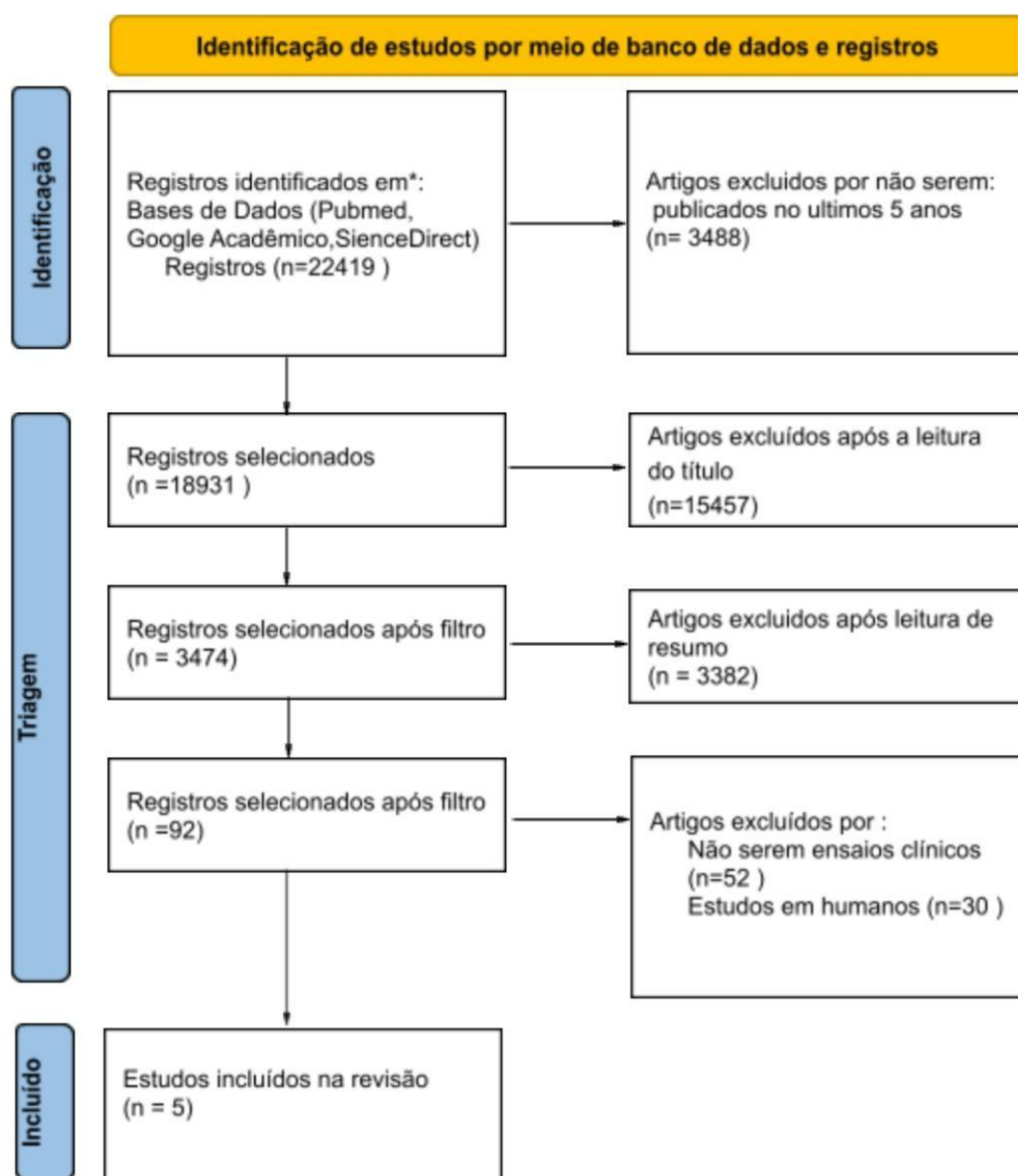
Para contornar essa limitação, estratégias de polimento por consenso e correção de erro híbrida (combinando dados de curta e longa leitura) são amplamente utilizadas, resultando em acurácia superior a 99% (JAIN et al., 2018).

Assim, a Oxford Nanopore destaca-se por sua versatilidade, portabilidade e capacidade de leitura longa, representando uma alternativa promissora para tipagem HLA de alta resolução, identificação de variantes estruturais e análises genômicas complexas. Sua aplicação crescente em laboratórios clínicos e de pesquisa reforça seu papel na modernização dos métodos de compatibilidade genética e na expansão da medicina personalizada aplicada ao transplante de medula óssea (LIPPERT et al., 2021).

### 3 METODOLOGIA

O presente estudo é uma revisão integrativa da literatura nacional e internacional, que tem como finalidade sintetizar resultados obtidos em pesquisas sobre um tema, de maneira sistemática, ordenada e abrangente. A revisão bibliográfica foi realizada nas bases de dados Google Acadêmico, PubMed (*US National Library of Medicine*) e ScienceDirect. Para a busca dos artigos, a seguinte combinação de descritores em ciências da saúde (DeCS) foi utilizada: “Sequenciamento de Nova Geração” e “Compatibilidade de Medula Óssea”. Em inglês, foi utilizada a seguinte combinação de MeSH *terms* (*Medical Subject Headings*): “*next-generation sequencing AND bone marrow histocompatibility*”, Todos os descritores e termos aplicados foram filtrados para estudos publicados a partir de 2021.

Foram selecionados estudos que após a leitura criteriosa e minuciosa, nortearam o processo de sistematização e interpretação. A análise e seleção se iniciaram com a leitura dos títulos, excluiu-se aqueles que não tinham foco no objetivo da revisão e também se apresentavam em duplicata. Na sequência, os resumos dos artigos foram lidos, e nesta fase foram excluídos aqueles que não avaliaram a utilização de Sequenciamento de Nova Geração na compatibilidade de medula óssea. Por fim, os estudos restantes foram lidos na íntegra. Trabalhos acadêmicos como, aqueles de conclusão de curso, dissertações e teses foram excluídos da seleção (Figura 1).



Fonte: (Adaptado de PRISMA, 2020)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final das análises, foram selecionados quatro estudos realizados em diferentes regiões: Alemanha (25%), Espanha (25%), Brasil (25%) e Rússia (25%), com predomínio de delineamentos observacionais. Em relação à caracterização das amostras, observou-se que a maioria dos indivíduos incluídos eram doadores voluntários de medula óssea, provenientes de registros nacionais e internacionais. Para a realização do estudo, foram utilizadas metodologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), associadas a análises confirmatórias por meio do sistema SBT (Sequence-Based Typing), garantindo maior precisão e confiabilidade na identificação dos resultados. A amostra do estudo foi composta por indivíduos de ambos os sexos, adultos, incluindo uma proporção de migrantes e nativos da Europa, além de doadores cadastrados nos sistemas REDOME e Kirov, contribuindo para uma análise mais representativa da diversidade genética populacional.

Os estudos demonstram de forma consistente que a utilização do Sequenciamento de Nova Geração representa um avanço significativo na tipagem de HLA, proporcionando maior resolução e precisão na identificação dos alelos. Esse aprimoramento impacta diretamente a seleção de doadores, aumentando as chances de compatibilidade em transplantes de células-tronco hematopoéticas. Em relação à metodologia, os estudos incluídos compreenderam estudos observacionais destaca-se que o número de participantes variou entre os estudos, sendo o maior composto por 21.787 indivíduos e o menor por 9.100, todos adultos e doadores voluntários de transplante de medula óssea, o que contribuiu para maior robustez e confiabilidade dos resultados apresentados.

Além disso, evidências mostram que o uso do NGS não apenas melhora a acurácia da tipagem, mas também possibilita a identificação e confirmação de novos alelos HLA, como observado nos estudos que relataram a descoberta e validação de variantes raras. Esse fator contribui significativamente para o enriquecimento dos bancos de dados genéticos e para uma melhor representação da diversidade populacional (AKINTUNDE et al., 2023). Em relação à seleção de doadores, um estudo de coorte realizado por Gomez et al. (2025), envolvendo 21.787 amostras de pacientes adultos de ambos os sexos cadastrados em sistemas de doadores, demonstrou que a utilização do NGS ampliou as informações disponíveis no banco

de dados, aumentando as chances de identificação de doadores compatíveis e possibilitando a identificação de 236 novos alelos HLA.

Ademais, estudos realizados no Brasil foram empregados para a confirmação e caracterização de cinco alelos raros do gene HLA-DRB1, utilizando amostras de doadores cadastrados no sistema REDOME. Para isso, foi aplicada a metodologia de Sequenciamento de Nova Geração por meio da plataforma Illumina iSeq 100. Os resultados foram submetidos a reanálise e re-sequenciamento, garantindo maior confiabilidade dos dados obtidos. Dessa forma, foi possível não apenas confirmar a presença dos cinco alelos HLA-DRB1, mas também promover a extensão de suas sequências completas, anteriormente descritas de forma parcial, além de validar esses achados por meio de re-sequenciamento de alta precisão (MOLINARI et al., 2025). Nesse contexto, observa-se também a diversificação dos resultados em diferentes populações, como evidenciado em estudos realizados na Rússia. O estudo conduzido por Loginova et al. (2022) teve como foco a identificação e caracterização de novos alelos HLA, contribuindo para a atualização do banco de dados IPD-IMGT/HLA e para melhor caracterização genética dos doadores.

Corroborando a importância da diversidade genética na ampliação da compatibilidade em transplantes, o estudo conduzido por Heinemann et al. (2024), na Alemanha, evidenciou a relevância do recrutamento de doadores com histórico migratório. A pesquisa incluiu 9.217 indivíduos adultos de ambos os sexos, sendo 4.153 migrantes e 5.064 europeus, com amostras provenientes de sangue periférico. Os resultados demonstraram que doadores migrantes apresentaram maior frequência de alelos HLA raros, contribuindo significativamente para o aumento das chances de compatibilidade em transplantes, especialmente em pacientes com perfis genéticos menos comuns. Entretanto, observou-se também uma maior taxa de cancelamento nesse grupo, indicando a presença de desafios logísticos que devem ser considerados no planejamento e gestão dos registros de doadores (HEINEMANN et al., 2024).

A superioridade do NGS na tipagem HLA está relacionada à sua capacidade de sequenciar múltiplas regiões gênicas simultaneamente, permitindo distinguir alelos muito semelhantes entre si. Enquanto métodos convencionais podem identificar apenas grupos alélicos ou gerar ambiguidades em indivíduos heterozigotos, o NGS permite maior resolução alélica, reduzindo incertezas na interpretação dos resultados e favorecendo a seleção de doadores mais

compatíveis. Diante do exposto, observa-se que, embora as tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração apresentem elevado potencial na genotipagem de alta resolução, especialmente em loci altamente polimórficos como o sistema HLA, ainda existem limitações técnicas e operacionais que impactam sua ampla aplicabilidade na histocompatibilidade de medula óssea. Entre os principais desafios, destacam-se a precisão bruta de leitura inferior em algumas plataformas, quando comparadas a tecnologias ópticas como a Illumina, além de limitações relacionadas ao custo, rendimento de dados e dificuldades na análise de regiões complexas (JAIN et al., 2018; EID et al., 2019; RHOADS; AU, 2015). Em muitos centros laboratoriais, a implementação do NGS ainda é limitada devido ao elevado investimento financeiro necessário para aquisição de equipamentos, manutenção das plataformas e treinamento especializado das equipes técnicas.

Ademais, questões como erros em regiões homopoliméricas em determinadas plataformas, bem como o curto comprimento das leituras e a necessidade de infraestrutura computacional robusta para análise e armazenamento dos dados, também representam entraves relevantes para a expansão do uso do NGS (ROTHBERG et al., 2011; METZKER, 2010; GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). Outro fator limitante refere-se à necessidade de padronização entre protocolos laboratoriais e softwares de interpretação, uma vez que diferenças metodológicas podem interferir na reprodutibilidade dos resultados e na comparação entre bancos de dados internacionais. Além disso, a elevada complexidade genética do sistema HLA continua sendo um desafio importante, especialmente em populações altamente miscigenadas, dificultando a identificação de doadores totalmente compatíveis.

Nesse contexto, estratégias como o uso de abordagens híbridas, combinando leituras curtas e longas, além do aprimoramento de algoritmos de correção de erros e polimento por consenso, têm se mostrado eficazes para aumentar a acurácia dos resultados, podendo alcançar níveis superiores a 99% (JAIN et al., 2018). Nesse sentido, investimentos em inovação tecnológica, redução de custos operacionais, ampliação da infraestrutura laboratorial e capacitação profissional são fundamentais para otimizar a utilização do NGS na prática clínica. Dessa forma, apesar das limitações ainda existentes, o Sequenciamento de Nova Geração apresenta grande potencial para consolidar-se como uma das principais ferramentas na seleção de

doadores e na melhoria da compatibilidade imunológica em transplantes de células-tronco hematopoéticas.

Assim, com a evolução contínua dessas ferramentas e a superação gradual de suas limitações, espera-se que o NGS se consolide cada vez mais como uma tecnologia essencial na prática clínica, contribuindo significativamente para a medicina personalizada, a imunogenética e a otimização da compatibilidade em transplantes.

Quadro 1 - Caracterização dos estudos incluídos na revisão integrativa+

| Referência e País                    | Tipo de estudo       | N amostral   | Objetivo                                                                                                                                                              | Caracterização da amostra                                                 | Metodologias de sequenciamento de Nova Geração                                                  | Principais resultados                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------|----------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F.M. Heineman et al. 2024 (Alemanha) | Estudo observacional | Total: 9100  | Recrutar doadores migratório e analisar seus perfis de HLA para aumentar a disponibilidade de doadores compatíveis, especialmente para pacientes com alelos HLA raros | Migrantes: 4153 europeus: 5064 Ambos os sexos , adultos sangue periférico | Tipagem:HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 definição de alelos raros frequência 1:100                | Doadores com histórico migratório apresentaram maior frequência de alelos HLA raros e aumentaram significativamente a chance de encontrar compatibilidade para transplantes. No entanto, também mostraram maior taxa de cancelamento, indicando desafios logísticos nesse grupo. |
| Gomez et al. 2025 (Espanha)          | Estudo observacional | Total: 21787 | Utilizar NGS nos registros para seleção de doadores                                                                                                                   | Pacientes ambos os sexos cadastrados de 2016 e 2023 Sangue periférico     | Tipagem:HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DQA1, DPA1, DPB1, E e G                                        | Identificados 236 alelos novos, frequências semelhantes a de outras populações europeias                                                                                                                                                                                         |
| Molinari et al 2025 (Brasil)         | Estudo observacional | NA           | Confirmar e caracterizar 5 alelos HLA-DRB1 raros                                                                                                                      | Doares cadastrado no REDOME Leucócitos do sangue periférico               | Ngs com plataforma: Illumina iSeq 100 Reanálise e re-sequenciamento para confirmação dos alelos | Confirmação de 5 alelos HLA-DRB1:Extensão das sequências completas (antes eram parciais) Validação dos alelos por re-sequenciamento (alta confiabilidade)                                                                                                                        |
| Loginova et al. 2022 (Rússia)        | Estudo observacional | NA           | Identificar e caracterizar novos alelos HLA; Contribuir para a atualização do banco de dados IPD-IMGT/HLA                                                             | Doadores voluntários de medula óssea do registro de Kirov (Rússia)        | tipagem HLA por NGS + confirmação por SBT                                                       | Descoberta de novos alelos com alta precisão;melhor caracterização genética de doadores; contribui diretamente para:melhor compatibilidade em transplantes                                                                                                                       |

HLA:Antígeno Leucocitário Humano;NGS: Sequenciamento de Nova Geração;SBT:Tipagem Baseada em Sequenciamento;REDOME: Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea  
 fonte: próprio autor (2026).

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante dos estudos analisados, conclui-se que o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) representa um importante avanço na tipagem de HLA para transplantes de células-tronco hematopoéticas, proporcionando maior precisão, sensibilidade e resolução na identificação de alelos, inclusive variantes raras. A utilização dessa tecnologia contribui significativamente para a ampliação da compatibilidade entre doador e receptor, reduzindo riscos de complicações imunológicas e favorecendo melhores desfechos clínicos. Além disso, o NGS possibilita o enriquecimento dos bancos de dados genéticos e uma representação mais ampla da diversidade populacional, auxiliando na identificação de doadores compatíveis. Entretanto, ainda existem limitações relacionadas aos altos custos, necessidade de infraestrutura tecnológica especializada, processamento de dados e padronização metodológica entre laboratórios.

Dessa forma, torna-se necessário o investimento contínuo em inovação tecnológica, capacitação profissional e ampliação dos registros de doadores, visando otimizar a aplicação do NGS na prática clínica e fortalecer seu papel na histocompatibilidade e medicina personalizada em transplantes de células-tronco hematopoéticas.

## REFERÊNCIAS

- AKINTUNDE, O.; TUCKER, T.; CARABETTA, V. J. Advances in next-generation sequencing technologies for HLA typing and transplantation compatibility. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 14, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- BAZINET, A.; POPRADÍ, G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Current Oncology*, Toronto, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6588058/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- CARRERAS, E.; DUFOUR, C.; MOHTY, M.; KRÖGER, N. *The EBMT Handbook*. Bethesda: NCBI Bookshelf, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- COPEC. DNA sequencing: techniques and applications. *INTERTECH Conference Proceedings*, 2013. Disponível em: <https://copec.eu/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- CRANE, C. et al. High-resolution HLA genotyping improves PIRCHE-II assessment of molecular mismatching in kidney transplantation. *Human Immunology*, New York, v. 85, n. 3, p. 1-9, 2024.
- DEBENHAM, J.; KIM, J.-Y. Challenges and future perspectives in HLA typing for hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation Reviews*, Amsterdam, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- EID, J. et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, Washington, v. 323, n. 5910, p. 133-138, 2019.
- FRONTIERS IN IMMUNOLOGY. Non-HLA immunogenetic factors in hematopoietic stem cell transplantation outcomes. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology>. Acesso em: 27 maio 2026.
- GOMEZ, R. et al. Application of next-generation sequencing in donor registry expansion and identification of novel HLA alleles. *Human Immunology*, New York, v. 86, n. 2, p. 115-124, 2025.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016.
- GRAGERT, L. et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *New England Journal of Medicine*, Boston, 2014. Disponível em: <https://www.nejm.org/>. Acesso em: 27 maio 2026.
- HEINEMANN, F. M. et al. Recruitment of donors with migratory background improves identification of rare HLA alleles in stem cell donor registries. *Bone Marrow Transplantation*, London, v. 59, n. 1, p. 45-53, 2024.

ILLUMINA. Introduction to Illumina sequencing. San Diego: Illumina, 2024. Disponível em: <https://www.illumina.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

JAIN, M. et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*, New York, v. 36, n. 4, p. 338-345, 2018.

KHADDOUR, K.; HANA, C. K.; MEWAWALLA, P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: STATPEARLS. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing: concepts and limitations. *BioEssays*, Cambridge, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

LEE, M. Y. et al. The importance of confirming false homozygosity in pretransplant HLA typing results of patients with hematologic malignancies. *International Journal of Medical Sciences*, Hong Kong, v. 21, n. 13, p. 2430-2436, 2024.

LEE, S. J. et al. High-resolution HLA matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood*, Washington, 2007. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood>. Acesso em: 27 maio 2026.

LIPPERT, C. et al. Accurate high-resolution HLA typing using Oxford Nanopore long-read sequencing. *Human Immunology*, New York, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

LOGINOVA, E. et al. Identification and characterization of novel HLA alleles in Russian donor populations using next-generation sequencing. *HLA*, Copenhagen, v. 100, n. 5, p. 512-520, 2022.

MANGUM, D. S. et al. A clinician's guide to HLA matching in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bethesda: NCBI Database, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 27 maio 2026.

MARTIN, M. et al. Full-length HLA typing using PacBio HiFi sequencing for improved donor-recipient matching in stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/>. Acesso em: 27 maio 2026.

METZKER, M. L. Sequencing technologies: the next generation. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MOLINARI, A. C. et al. Confirmation and characterization of rare HLA-DRB1 alleles using next-generation sequencing in Brazilian REDOME donors. *Human Immunology*, New York, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2025.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. Oxford Nanopore sequencing technology overview. Oxford: ONT, 2024. Disponível em: <https://nanoporetech.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

PACIFIC BIOSCIENCES. SMRT Sequencing technology overview. California: PacBio, 2024. Disponível em: <https://www.pacb.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

PASSWEG, J. R. et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2020 and trends over the last 30 years. Bone Marrow Transplantation, London, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/bmt/>. Acesso em: 27 maio 2026.

RHOADS, A.; AU, K. F. PacBio sequencing and its applications. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, Beijing, v. 13, n. 5, p. 278-289, 2015.

ROCHA, C. V. T. et al. Histocompatibilidade e transplante de células-tronco hematopoiéticas: avanços e perspectivas. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

ROCHA, C. V. T. et al. Importância da histocompatibilidade no sucesso do transplante de medula óssea: uma revisão do sistema HLA. Hematology, Transfusion and Cell Therapy, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531137923011550>. Acesso em: 27 maio 2026.

ROCHA, V. et al. HLA compatibility and outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation, London, v. 58, n. 7, p. 899-907, 2023.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature, London, v. 475, n. 7356, p. 348-352, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, 1977. Disponível em: <https://www.pnas.org/>. Acesso em: 27 maio 2026.

SATAM, H.; JOSHI, K.; MANGROLIA, U. et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology, Basel, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

SU, J. HLA matching strategies in diverse populations: implications for hematopoietic transplantation. Journal of Hematology & Oncology Research, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Ion Torrent next-generation sequencing technology. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific, 2024. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/>. Acesso em: 27 maio 2026.

WRIGHT, C. et al. Host versus graft HLA-DP mismatching promotes graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation, London, v. 58, p. 950-952, 2023.