



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação Em Biotecnologia

KEYLLA MARIA DE SÁ URTIGA AITA

**SISTEMA ESPECIALISTA FACILITADOR DA IDENTIFICAÇÃO EPITÓPICA DA
ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI –HLA PRÉ-FORMADO EM SORO DE
CANDIDATOS A TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS E TECIDOS**

TERESINA-PI

2016

KEYLLA MARIA DE SÁ URTIGA AITA

**SISTEMA ESPECIALISTA FACILITADOR DA IDENTIFICAÇÃO DA
ESPECIFICIDADE EPITÓPICA DO ANTICORPO ANTI –HLA PRÉ-FORMADO
EM SORO DE CANDIDATOS A TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS E TECIDOS**

Tese de Doutorado apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA – Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte

TERESINA-PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A311s Aita, Keylla Maria de Sá Urtiga.

Sistema especialista facilitador da identificação da especificidade epitópica do anticorpo anti -HLA pré-formado em soro de candidatos a transplante de órgãos e tecidos / Keylla Maria de Sá Urtiga Aita, 2016.

75 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) - Universidade Federal do Piauí, 2016.

"Orientação: Prof^a Dr^a Samiramis Jamil Hadad do Monte."

1. Análise Epitópica. 2. HLA. 3. Sistemas Especialistas. 4. Software. 5. Epítopos. I. Título.

KEYLLA MARIA DE SÁ URTIGA AITA

SISTEMA ESPECIALISTA FACILITADOR DA IDENTIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE EPITÓPICA DO ANTICORPO ANTI –HLA PRÉ-FORMADO EM SORO DE CANDIDATOS A TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS E TECIDOS

Tese de Doutorado apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 06 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte - Orientadora
Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, LIB - UFPI

Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva
Departamento de Biologia, UFPI

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima
Departamento de Química, UESPI

Prof. Dr. Marco Antônio Gutierrez (Externo à Instituição)
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
Universidade Estadual de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Vinícius Ponte Machado (Externo ao Programa)
Departamento de Computação, UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese inteiramente ao meu pequeno príncipe Eduardo Sá Urtiga Aita, anjo que temos no céu. Quero deixar sua história aqui registrada porque acredito que nada acontece por acaso. Desde o dia que recebi o convite do Prof. Luiz Cláudio para desenvolver um projeto na área de transplantes de órgãos, imediatamente senti que o Eduardo estava no comando e que Deus tinha um plano para mim.

Eduardo nasceu no dia 21 de junho de 2009, um bebê lindo, planejado e muito esperado. Porém, durante toda gravidez estivemos apreensivos, pois, em nenhum exame de ultrassom, foi visualizada a sua vesícula biliar. Sabíamos que existiam três possibilidades para justificar o fato: (1) a vesícula existia, mas não estava sendo visualizada, (2) agenesia de vesícula e (3) Atresia de Vias Biliares, nessa ordem de gravidade. Após seu nascimento, foi constatado que realmente ele não tinha a vesícula biliar, porém, como apresentava um excelente estado geral, continuamos acreditando que tudo estaria certo com a saúde dele.

Após um mês de vida, Eduardo começou a apresentar uma icterícia progressiva o que fatalmente culminou no diagnóstico de Atresia de Vias Biliares, uma colangiopatia inflamatória de recém nascidos que resulta em obstrução total das vias biliares extra hepáticas, cuja possível e remota correção pode ser feita por meio de um procedimento cirúrgico chamado portoenterostomia (Kasai). Quando tivemos ciência desse diagnóstico, meu mundo, minha fé e minhas forças desapareceram, só enxergava o sofrimento dele e o nosso, pois já sabíamos que o prognóstico era péssimo.

Aos 2 (dois) meses e 8 (oito) dias Eduardo foi submetido ao Kasai, que, infelizmente, restabeleceu o fluxo biliar por apenas 2 meses. Em outubro de 2009, com 4 meses de vida, a saúde do Eduardo se complicava dia após dia e, devido à raridade da doença, não havia equipe médica que pudesse acompanhá-lo em Teresina, assim eu e meu esposo, Giuliano, tivemos que nos mudar imediatamente para São Paulo. Nessa época, nossa primogênita, Giovana, tinha 3 anos de idade e, além de abandonar nossos trabalhos e nossa casa, tivemos também que deixá-la aos cuidados da família, pois ali se iniciava uma luta sobre-humana para salvar a vida do Eduardo. Praticamente dissemos “tchau” para a nossa minha filha num dia e no outro fomos embora. Não havia tempo para despedidas ou para explicações, não havia entendimento possível, na verdade, não compreendíamos nada, tínhamos somente que agir rápido... foi o segundo grande golpe que recebemos em um curto espaço de 4 meses.

Em São Paulo, Eduardo esteve sob os cuidados da Dra. Irene Miura, por quem nutrimos eterna gratidão e respeito, impossível expressar em palavras quão humana ela é. Em novembro de 2009, a doença do Eduardo progredia rapidamente e o transplante de fígado era a única alternativa possível para salvar a sua vida. Assim, ele foi incluído na lista de pacientes à espera por um transplante hepático, e, em poucas semanas, ocupou o topo da lista, devido ao estadiamento da doença. Ficamos exatos 2 meses e 5 dias à espera de um doador para ele. O que passamos neste interim é indizível, está cravado para sempre no nosso coração e na nossa memória, pois a dor e o sofrimento nunca esqueceremos. No dia 10 de janeiro de 2010, Eduardo foi submetido ao transplante, com apenas 6 meses de vida. Devido a uma série de complicações no pós-transplante, nosso filho faleceu no dia 31 de janeiro de 2010, aos 7 meses de idade.

Escrever esse relato me fez reconstruir cada passo dado, cada momento vivido - os últimos com o Eduardo. Aqueles 21 dias na UTI infantil do hospital A. C. Camargo, o susto, os minutos que pareciam horas, eu em pé ali na porta da UTI esperando a boa notícia de que tudo não passou de um susto. Notícia que nunca veio...somente a Dra. Irene dizendo "Filha, não podemos fazer mais nada pra salvar a vida dele". Para quem já passou por isso, ou para quem nem imagina, eu digo aqui. É nesse momento, nesse exato momento, que a Terra para de girar. A respiração para. Uma pausa. E o chão se abre embaixo dos pés, num abismo sem volta. Os momentos dramáticos que se sucederam só puderam ser superados pela presença da Giovana, pois num momento desses nos falta absolutamente tudo, inclusive a vontade de viver. Particularmente, consegui continuar vivendo por Giovana, porque ela não merecia ter uma mãe triste e depressiva, ela não tinha culpa do que nos aconteceu e precisava muito de mim. Mais tarde, em 2011, nasceu o Heitor trazendo consigo a alegria de volta para as nossas vidas.

Uma vez li que não é necessário que haja o sofrimento para se obter graças, mas, onde houver o sofrimento, as graças surgirão de inúmeras maneiras. Apenas seis meses após a partida do Eduardo fui aprovada num concurso para professor efetivo da UFPI, essa conquista foi o impulso que precisava para retomar minha carreira profissional e recomeçar. Representou a esperança do retorno a uma vida que fizesse sentindo, com novos propósitos e realizações. Em pouco tempo no exercício da função, fui convidada a ingressar em um grande projeto que tinha como objetivo aumentar as chances de sucesso em transplantes para pacientes hipersensibilizados, auxiliando na localização de um doador com baixo risco imunológico para o transplante. Pensei: “não é possível!”. Como poderia eu não associar

todas essas graças ao meu filho? Eu tinha tanta vontade de ajudar pessoas e famílias nessa situação, pedia a Deus que me revelasse como, mas não era médica, nem sequer da área da saúde, e não sabia o que poderia fazer, nem por onde começar. De repente, mas não por acaso, conheci os meios.

Hoje, me alivio em saber que, com muita força e a fé em Deus recobrada, consegui completar seis anos sem a presença dele. Lembro que não foi fácil passar pelos aniversários dele, os meus, os Natais, os Dias das Mães, sempre me perguntando "onde ele estaria?". Hoje me permito sentir a satisfação que me traz esse título de doutora, satisfeita ainda mais por ter contribuído, ainda que minimamente, para um projeto tão grandioso. Celebro hoje a chance que tenho de me dizer, a cada ano que se passa, que não estou sofrendo tudo pela primeira vez, seis anos já se passaram. Será agora mais um dia, mais um aniversário, a minha defesa de tese, mais uma data qualquer sem ele, embora saiba que não é tão fácil assim. Completar esta fase é concluir que a vida continua mesmo. É o fim de um ciclo e começo de outro que, se Deus quiser, será ainda mais frutífero.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que contribuíram para que este trabalho se concretizasse. A todos que contribuíram de alguma maneira, meus sinceros agradecimentos. Mas algumas pessoas foram, de fato, fundamentais. Meus agradecimentos especiais:

- A Deus e a N.S. Perpétuo Socorro, que são meu refúgio e fortaleza em todos os momentos da minha vida, sustentando a minha fé e me fazendo acreditar que sou capaz;
- À minha família, meu esposo, Giuliano Aita e meus filhos, Giovana e Heitor, obrigada pelo amor, carinho, incentivo, paciência e compreensão diante de tantas ausências, cuidados e preocupações; vitórias e dificuldades na realização deste doutorado; de maneira muito especial ao meu esposo, por ser meu exímio exemplo de dedicação ao estudo e à profissão médica, pela inteligência que me inspira e pelo imensurável apoio e incentivo;
- Aos meus queridos pais e irmãs, que são as pessoas mais ONIPRESENTES desse mundo, porto seguro e conforto certo;
- Aos meus orientadores, Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad do Monte e Prof. Dr. Luiz Cláudio Demes da Mata Sousa, obrigada pela oportunidade de trabalhar em um grande projeto que me fez crescer como pessoa e como profissional, por acreditarem no meu trabalho, pelo reconhecimento, pelas horas dispensadas à minha formação, pelo compartilhamento de conhecimentos, por sua ajuda fundamental. Especificamente ao meu co-orientador, Prof. Luiz Cláudio, agradeço por me orientar na descoberta dessa oportunidade de pesquisa para o doutorado.
- Ao Prof. Dr. Adalberto Socorro, obrigada pela paciência e didática utilizadas na transferência do conhecimento sobre o processo da análise epitópica, pela cordialidade sempre, por sua grande ajuda;
- Ao Prof. Dr. Vinícius Ponte Machado, obrigada pela atenção e disposição constantes, pelo compartilhamento de conhecimentos sobre Inteligência Artificial que foram essenciais ao progresso deste trabalho;

- Aos alunos de iniciação científica que encontrei pelo caminho e que muito me ajudaram, obrigada, Renato Souza e Joana D'arc, por contribuírem em muitas ações indispensáveis à conclusão desse projeto;

- Aos colegas do Pmadt, Mário Sérgio Marroquim e Gilberto Coelho, obrigada pela disponibilidade constante em colaborar com o meu trabalho e pela contribuição de um ambiente tão fértil para criação de projetos, tecnologia e inovação.

- E a todos aqueles, amigos e colegas de trabalho, aos quais aqui não citei nomes, mas que foram importantes para que eu chegasse até aqui.

“Os sistemas especialistas precisam ser ricos em conhecimento se forem pobres em método. O poder reside no conhecimento.” (*Edward Feigenbaum, Universidade de Stanford*)

RESUMO

A compatibilidade HLA (*Human Leukocyte Antigen*) entre o par doador e um candidato a transplante de órgãos ou tecidos depende da identidade da molécula HLA, considerada como o principal antígeno no transplante. Teoricamente, o doador ideal é aquele cujas moléculas HLA são compartilhadas pelo receptor. Entretanto, essa condição é rara e, na maioria das vezes, o transplante é realizado entre pares com disparidades HLA. Isso pode acarretar ativação do sistema imune do receptor, que se sensibiliza para os antígenos HLA, o que favorece tanto a ocorrência de rejeição quanto uma menor sobrevida do enxerto, além da dificuldade para identificar um novo doador compatível. Assim, mais do que identificar uma combinação perfeita entre doador e receptor, pode-se usar o conceito de compatibilidade HLA entre os pares, pois, embora não haja identidade total, as regiões HLA do doador, que são passíveis de reconhecimento pelo sistema imune do receptor, são compartilhadas e não são capazes de ativar uma resposta imune, logo são moléculas adequadas para o transplante. Essas estruturas moleculares responsáveis pela interação com os receptores de linfócitos T e B e/ou interação com anticorpo pré-formado são denominadas de epítomos estruturais e o processo de identificação desses epítomos para determinar a formação do par doador-receptor mais adequado para o transplante denomina-se: análise da reatividade epitópica, tendo como componente essencial, o eplet. Devido à sua complexidade, tem-se encontrado muita resistência para inserir a análise da reatividade epitópica na rotina clínica laboratorial. Neste sentido, muitos esforços têm sido despendidos para minimizar esse impacto. Com base no primeiro algoritmo para facilitar a análise da reatividade epitópica (*HLAMatchmaker*), o grupo de pesquisa do LIB – UFPI vem desenvolvendo, desde 2008, ferramentas que facilitam o processo de análise e contribuem para a universalização e uso do conceito de análise epitópica, culminando, em 2013, com o desenvolvimento do *software* EpViX. O EpViX é um importante programa facilitador do uso do conhecimento da compatibilidade epitópica, contudo, a fase de análise da reatividade epitópica de todos os potenciais receptores em lista de espera permanece laboriosa, repetitiva e manual. Além disto, não se dispõe de muitos recursos humanos qualificados para sua execução, bem como para o treinamento de novos usuários nos laboratórios de histocompatibilidade, o que nos fez propor um sistema especialista, denominado EpAssistant, capaz de identificar automaticamente a especificidade epitópica do anticorpo anti-HLA pré-formado no soro de candidatos a transplante de órgãos sólidos para acelerar essa importante etapa na fase do pré-transplante e ser, também, uma ferramenta para educar e ensinar novos usuários nesse campo do conhecimento.

Palavras-chave: Análise epitópica, HLA, sistemas especialistas, *software*, epítomos.

ABSTRACT

The HLA (Human Leukocyte Antigen) compatibility between the donor pair and organ or tissue transplantation candidate depends on the identity of the HLA molecule, which is considered the main antigen in transplantation. The ideal donor, therefore, is one in which all HLA molecules expressed in their cells are also shared by the recipient. However, this condition is rare and, most of the times, the transplantation is performed with great differences, resulting in activation of the receptor of the immune system, making it sensitized to HLA antigens, favoring the occurrence of graft rejection, lower survival and difficulty to identify a new compatible donor. Thus, rather than identifying a perfect match between donor and recipient, the HLA compatibility concept can be used between the pairs because, although there is no overall identity, the HLA regions of the donor, that are capable of recognition by the immune system of the recipient, are shared and are not able to activate an immune response, then they are suitable molecules pair to transplantation. These molecular structures responsible for the interaction with B and T cell receptors/ or interactions with preformed antibody are called structural epitopes and the process of identification of such epitopes to determine the formation of the most suitable donor-acceptor pair for transplantation is called: Epitope reactivity analysis and its essential component, the eplet. Due to its complexity, it has found a lot of resistance to insert the analysis of the epitope reactivity in clinical laboratory routine. In this sense, much effort has been made to minimize this impact. Based on the first algorithm to facilitate the analysis of the epitope reactivity (HLAMatchmaker), the LIB -UFPI research group has been developing tools that facilitate the process of analysis and contribute to the universalization and use of the concept of epitope analysis since 2008, culminating in 2013 through the EpViX software development. The EpViX is an important enabler program in the knowledge sharing process of epitopic compatibility, however, the analysis phase of the epitope reactivity of all potential receptors on the waiting list remains laborious, repetitive and manual. In addition, there are not enough qualified human resources for their performance as well as for training new users in histocompatibility laboratories, which led us to propose an expert system called EpAssistant which is able to automatically identify the epitope specificity of anti-HLA preformed antibody in the serum sodium of organ and tissue transplant candidates and thus accelerate this important step in the pre-transplant phase and it is also useful as an element to educate and teach new users in the field of knowledge.

Keywords: epitope analysis, HLA, expert systems, software, epitopes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Um antígeno HLA pode ser constituído por um conjunto único de epítomos, mas os epítomos individuais são frequentemente compartilhados com outros alelos HLA.	25
Figura 2: Técnicas manuais para aquisição do conhecimento.	30
Figura 3: Projetos de programação heurística inspirados no dendral. Os programas cujos nomes estão dentro de caixas foram produtos de teses de doutorado.	35
Figura 4: Análise PSA via EpViX para um painel HLA de classe I: Em (A) o <i>Cut off</i> . Os filtros (B) <i>Unacceptable</i> e (C) <i>Reactive</i> são diferentes visões para o painel de epítomos funcionais que podem se apresentar nas cores azul, preto e vermelho.	40
Figura 5: Exemplo dos resultados obtidos com o protótipo implementado do Epassistant.	45
Figura 6: Metodologia de desenvolvimento exploratório.	46
Figura 7: Diagrama de estados representativo do algoritmo do Epassistant.	48
Figura 8: Trecho de um PSA classe I com análise epitópica feita pelo especialista humano a partir do <i>software</i> EpViX.	53
Figura 9: Resultados do Epassistant para o PSA da Figura 8.	55
Figura 10: Trecho de um painel de classe II com análise realizada pelo especialista.	56
Figura 11: Resultados do Epassistant para o PSA da Figura 10.	57
Figura 12: Simulação análise manual com <i>cut off</i> de 1500.	59
Figura 13: Resultado do Epassistant para o <i>cut off</i> de 1500 no painel da Figura 12.	61
Figura 14: Simulação análise manual com <i>cut off</i> 1000.	62
Figura 15: Resultado do Epassistant para a análise epitópica com <i>cut off</i> 1000.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela validação ferramenta Epassistant

64

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Aquisição do Conhecimento

API – Interface de Programação de Aplicativo (Application Programming Interface)

cPRA – Percentual de Sensibilização de um Paciente

EvXM - Prova Cruzada Virtual Epitópica

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigen)

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

JSON - *JavaScript Object Notation*

MFI - Intensidade Média de Fluorescência (Media Fluorescence Intensity)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

OPOs - Organizações de Procura de Órgãos

pmp – por milhão de população

PRA - Painel Reativo de Anticorpos

RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia

SAB - *Single Antigen Bead*

SBC – Sistema Baseado em Conhecimento

SE – Sistema Especialista

SEs – Sistemas Especialistas

SNT - Sistema Nacional de Transplantes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1	IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE	22
2.2	SISTEMAS ESPECIALISTAS	26
2.2.1	Aquisição do Conhecimento.....	28
2.2.1.1	Entrevistas	30
2.2.1.2	Observação.....	31
2.2.2	Representação do Conhecimento.....	32
2.2.3	Sistemas especialistas em saúde	34
3	METODOLOGIA.....	39
3.1	PROTOCOLO DE ESTUDOS	39
3.1.1	Painéis Single Antigen (PSA).....	39
3.1.1.1	Cut off ou Ponto de corte	41
3.1.1.2	Alelos	41
3.1.1.3	Epítomos	41
3.1.2	Análise Epitópica Manual	42
3.2	AQUISIÇÃO DO CONHECIMENTO	43
3.3	PROPOSIÇÃO DO MODELO	44
3.4	IMPLEMENTAÇÃO	47
3.4.1	Algoritmo do EpAssistant®	47
3.3.2	Refinamento do algoritmo	50
3.3.3	Tecnologias Utilizadas	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	CASO PSA CLASSE I – ANÁLISE TOTALMENTE CONCORDANTE	52
4.2	CASO PSA CLASSE II – ANÁLISE PARCIALMENTE CONCORDANTE	56
4.3	CASO 3 – SIMULAÇÃO PARA DEMONSTRAR A LÓGICA IMPLEMENTADA	58
5	CONCLUSÃO.....	65
6	TRABALHOS FUTUROS.....	66
7	ANEXOS	67
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA

Atualmente o transplante de órgãos e tecidos é alternativa terapêutica segura para o tratamento de diversas doenças, determinando melhoria na qualidade e na perspectiva de vida. Possibilitado pelo aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas, desenvolvimento de imunossuppressores e compreensão imunológica da compatibilidade e rejeição, o transplante de órgãos e tecidos deixou de ser um tratamento experimental e passou a figurar como procedimento eficaz no controle das insuficiências terminais de alguns órgãos e falência de alguns tecidos (PEREIRA, 2009).

O Brasil é o segundo país do mundo em número de transplantes, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O programa de transplantes brasileiro é bem consolidado e a sua regulamentação é justa, porém depende da atuação de vários profissionais em sequência, desde a identificação dos potenciais doadores até a efetivação dos transplantes e seu acompanhamento ambulatorial. Com mais de 190 milhões de habitantes, o Brasil está praticamente zerando a fila para transplantes de córneas, e atendendo a cerca de 40% da necessidade anual para transplantes renais e 30% dos transplantes hepáticos (“DIMENSIONAMENTO dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015)”, 2015, p.3).

O Ministério da Saúde mantém uma rede integrada em 25 estados e Distrito Federal sendo 26 Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos, 11 Câmaras Técnicas Nacionais, 680 Centros de Transplantes (hospitais), 1.074 equipes de Transplantes (por tipo de órgãos) e 60 Organizações de Procura de Órgãos (OPOs). Em 2011 ocorreu expansão da rede de atendimento em transplantes sendo que foram cadastrados 54 novos centros de transplantes e 72 novas equipes (16 centros e 11 equipes foram no Norte e Nordeste), 35 novas Organizações de Procura de Órgão. Conta-se ainda com 62 laboratórios de histocompatibilidade capacitados para realizar a tipificação HLA por biologia molecular e pesquisa de anticorpo anti-HLA nos candidatos em lista de espera por um transplante de órgãos.

Com relação ao transplante renal, modalidade mais realizada no Piauí, em 2015 a lista de espera por um rim no Brasil foi de 19.440 pacientes, sendo 2.381 na região Nordeste e 211 no Piauí (“ DIMENSIONAMENTO dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-

2015)”, 2015). O Piauí possui três centros transplantadores, todos localizados na Capital, Teresina. A Central tem estrutura apropriada, apoio da Secretaria de Saúde, mas ainda um baixo número de notificações e alta recusa familiar. O número de doadores efetivos, bem como o de transplantes, é inferior ao desempenho da região Nordeste. No ano de 2015, realizaram-se 27 transplantes renais, sendo 24 com doador falecido, embora a necessidade estimada fosse de 192 transplantes.

A taxa dos transplantes de órgãos somados, no Brasil, em 2015, foi de 39 pmp (por milhão de população), enquanto nos países com melhores resultados está próxima a 100 pmp (objetivo máximo). A meta para o Brasil é atingir 50 transplantes pmp a partir dos próximos três anos e para os estados com melhor desempenho, realizar 75 transplantes pmp. Neste ano, ultrapassaram-se os 60 transplantes pmp, e os estados com melhor desempenho em transplante são o Rio Grande do Sul (67,0 pmp), São Paulo (64,9 pmp) e Distrito Federal (61,7 pmp) (“DIMENSIONAMENTO dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015)”, 2015).

Ainda que as medidas adotadas pelo SNT (Sistema Nacional de Transplantes) tenham sido bem sucedidas em aumentar o número de transplantes, as mesmas não foram exitosas em diminuir o número de pacientes em lista de espera. Um agravante desse cenário é o fato de que cerca de 30% dos pacientes que aguardam na fila de transplantes são sensibilizados para antígenos HLA (*Human Leukocyte Antigen*) por eventos prévios de gestação, transfusões sanguíneas ou transplantes (“DIMENSIONAMENTO dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015)”, 2015). Do ponto de vista prático, esses pacientes permanecem mais tempo em lista de espera em virtude das dificuldades de se encontrar um órgão compatível e têm elevada taxa de mortalidade. Dessa forma, urge estabelecer uma estratégia para transplantar receptores com anticorpos anti-HLA do doador.

A probabilidade de desenvolver anticorpo contra um antígeno HLA aumenta com a frequência de exposição ao antígeno estranho. Assim, mulheres têm em média 25% de chance de sensibilização para antígenos HLA após o 1º parto e de 50 a 60% após o 2º parto. O uso rotineiro de estimulantes de eritropoese em unidades de diálise reduziu a necessidade de transfusão e, com isso, receptor sensibilizado por transfusão equivale em média a 28% dos pacientes sensibilizados. Já os candidatos a retransplante mantêm-se problemáticos e constituem a nova prioridade para os programas de transplante renal. Esses receptores se tornam sensibilizados contra as diferenças HLA do órgão rejeitado. A incidência de

sensibilização depende do número de diferenças entre o doador e o receptor: frequentemente receptor em lista de espera para o transplante apresenta valor de Painel Reativo de Anticorpos (PRA) variando de 20 a 92%.

A compatibilização entre doadores e receptores é de extrema importância para a avaliação de risco imunológico em transplantes. Anticorpos anti-HLA são fatores de risco importantes para a rejeição a um transplante de órgãos sólidos e reconhecem regiões específicas nos antígenos HLA, denominadas **epítomos** (DUQUESNOY; MARRARI, 2002; DUQUESNOY, 2001). Antígenos HLA são constituídos por vários epítomos e há um crescente suporte experimental do conceito de que a compatibilidade doador-receptor deve ser analisada em nível epitópico (DUQUESNOY, 2014a). Determinar a especificidade dos anticorpos anti-HLA significa encontrar um doador com moléculas HLA para as quais o receptor não possui anticorpos pré-formados. Receptores hipersensibilizados para moléculas HLA possuem uma maior quantidade de anticorpos pré-formados e portanto, uma menor chance de transplante devido ao seu alto risco imunológico, que reduz a quantidade de doadores compatíveis. Como resultado, há um acúmulo de receptores em lista de espera e uma elevada mortalidade.

A identificação de epítomos potencialmente imunogênicos, responsáveis pela imunogeneticidade das incompatibilidades HLA é o produto fundamental da análise da reatividade epitópica e determina a formação do par doador-receptor mais adequado para o transplante (DUQUESNOY, 2014b). Do ponto de vista histórico, destacam-se dois elementos importantes para a identificação desses epítomos. Primeiro, a descrição teórica dos epítomos por René Duquesnoy (DUQUESNOY, 2001) e aquelas identificadas em modelos experimentais por Terasaki (TERASAKI, 2003). A universalização dos testes *Single Antigens Beads* (SAB), um exame laboratorial que possui moléculas HLA isoladas na superfície de partículas sintéticas que, ao serem colocadas em contato com o soro do receptor, permitem identificar os soros que têm anticorpos anti-HLA e quais seriam as moléculas HLA que estão sendo reconhecidas. O SAB permitiu identificar a especificidade do anticorpo pré-formado não apenas indicando que esse anticorpo reconhece uma determinada molécula HLA, mas especificamente qual a parte da molécula HLA ou epítomo está sendo reconhecida.

Para facilitar a análise da reatividade epitópica, René Duquesnoy propôs o algoritmo *HLAMatchmaker* (DUQUESNOY; MARRARI, 2002), que foi desenvolvido em um conjunto de planilhas excel contendo a lista de epítomos HLA preditos por ele e alvos em potencial dos

anticorpos anti-HLA pré-formados no soro dos pacientes em lista de espera para transplante. Todavia, o *HLAMatchmaker* não foi capaz de universalizar o uso do conceito da reatividade epitópica porque as análises de compatibilidade doador-receptor eram demoradas e difíceis de ser feitas utilizando as planilhas existentes. Sendo assim, em 2008, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí LIB - UFPI desenvolveu o programa EpHLA (SOUSA *et al.*, 2011) – produto da tese de doutorado RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia) do Prof. Dr. Luiz Cláudio Demes da Mata Sousa - que expandiu a funcionalidade do algoritmo do *HLAMatchmaker*. O EpHLA facilitou a análise da reatividade epitópica, pois disponibilizou uma interface gráfica e um banco de dados centralizado, nos quais os exames de receptores e doadores eram armazenados de forma segura e estruturada em uma base de dados Access¹.

Em 2012, o programa EpHLA foi validado e mostrou ter a mesma acurácia do *HLAMatchmaker*, até oito vezes mais rápido (SALES FILHO *et al.*, 2012). Em 2014, para ampliar as funcionalidades do EpHLA, foi implementada a Prova Cruzada Virtual Epitópica (EvXM) entre um doador e múltiplos receptores ou entre um receptor e diversos doadores e o programa passou a ser chamado de EpViX www.epvix.com.br (ANUNCIACÃO *et al.*, 2015) que, além de realizar a EvXM, integra e permite ao usuário acompanhar todas as fases do processo de transplante de órgãos.

Uma das funcionalidades mais importantes do EpViX é dispor de um ambiente interativo para que a análise da reatividade epitópica possa ser realizada de maneira clara e segura. Embora o EpViX ofereça este aparato computacional, por meio de uma interface gráfica desenvolvida em anuência aos princípios da Interação Humano-Computador e Usabilidade de Sistemas há um conhecimento prévio requerido para se realizar a Análise da Reatividade Epitópica que o *software* não é capaz de oferecer ao usuário não treinado.

Considerando-se a grande importância da análise epitópica como tarefa prévia e indispensável à realização da EvXM e a indisponibilidade de recurso humano capacitado que possa oferecer um treinamento adequado para a realização das análises epitópicas, o que pode dificultar a disseminação e causar resistência ao uso do EpViX, foi desenvolvido o software

¹ Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados da Microsoft que permite desenvolvimento rápido de aplicações (RAD - *Rapid Application Development*) envolvendo tanto banco de dados como também a interface a ser utilizada pelos usuários.

EpAssistant, um sistema especialista que possibilita a identificação automática da especificidade epitópica do anticorpo anti-HLA pré-formado no soro de candidatos a transplante, como produto desta Tese de doutorado em biotecnologia. Esta ferramenta encontra-se registrada no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) com o número BR 51 2016 0005149 e destina-se a identificar automaticamente a especificidade epitópica do anticorpo anti-HLA pré-formado no soro de candidatos a transplante de órgãos e tecidos.

1.2 OBJETIVOS

Identificar automaticamente a especificidade epitópica do anticorpo anti-HLA pré-formado no soro de candidatos a transplante de órgãos sólidos.

No alcance do Objetivo Geral, são estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Facilitar e agilizar o trabalho do especialista humano, dando-lhe sugestões de análise consistentes para serem consideradas;
- Disseminar o conhecimento sobre o conceito da compatibilidade epitópica:
 - Publicação de trabalhos em periódicos indexados nas áreas envolvidas.
- Criar uma base de dados estruturada dos casos clínicos para, em trabalhos futuros, utilizar algoritmos de aprendizagem de máquina para subsidiar a construção de sistemas inteligentes.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é apresentada uma visão geral sobre a Imunologia do Transplante, a realização de um resgate dos principais conceitos e práticas que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, enfatizando aspectos associados aos processos de informatização pelos quais vem passando esta área. Em continuidade, caracterizam-se os fundamentos sobre a Engenharia do Conhecimento que orientaram a criação do Modelo proposto.

2.1 IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE

Transplante de órgãos e tecidos é uma modalidade terapêutica universal na prática médica (TRIVEDI *et al.*, 2007). O avanço do conhecimento no campo da imunologia e o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras, tornou possível o transplante com doadores não aparentados. Todavia, na presença de maior incompatibilidade HLA, maior a probabilidade de se ter ativação imunológica aos aloantígenos. Reexposição subsequente aos mesmos antígenos ou estruturalmente relacionados, bem como a presença de anticorpos anti-HLA pré-formados, causam resposta imune humoral e celular vigorosa - de difícil controle com agentes imunossupressores usuais, acarretando, na maioria das vezes, perda do enxerto.

Dessa forma a importância da resposta imune humoral foi inicialmente comprovada por Terasaki em 1965, quando mostrou que o enxerto não sobrevivia na presença de anticorpos anti-HLA pré-formados e idealizou a prova cruzada entre doador e receptor como exame definidor do transplante (PATEL; TERASAKI, 1969). A continuidade dos estudos demonstrou que pacientes com anticorpos anti-HLA do doador tem menor sobrevida do enxerto e a presença desse anticorpo é fator de risco para rejeição crônica humoral (TERASAKI, 2003).

A tarefa de achar um doador compatível tem se mostrado ainda mais difícil nos pacientes hipersensibilizados (cPRA \geq 85%) – que possuem anticorpos pré-formados contra grande parte dos antígenos HLA da população. (CLAAS *et al.*, 2004; DOXIADIS;

DUQUESNOY; CLAAS, 2005). Utilizando a compatibilidade alélica, é praticamente impossível encontrar um doador para esse tipo de receptor : já que ambos necessitariam de concordância total nos alelos do MHC (*Major Histocompatibility Complex*)². Dessa forma, os hipersensibilizados acabam esperando um tempo maior que os demais pacientes na maioria dos programas de transplante de órgãos e tecidos.

Para resolver tal problema, estão sendo estudadas duas estratégias principais. A primeira consiste em dessensibilizar o receptor contra os HLAs exclusivos do doador por meio de protocolos que removam os aloanticorpos do plasma do paciente. Já a segunda consiste em determinar incompatibilidades aceitáveis (“*mismatches*” aceitáveis) para o transplante (DOXIADIS; DUQUESNOY; CLAAS, 2005). Em estudo conduzido na Europa, ficou evidenciado que o programa de “*mismatch*” aceitável pode diminuir significativamente o tempo médio de espera por um rim quando comparado ao programa tradicional (18,6 meses x 9,7 meses). Isso, sem diminuir o tempo médio de sobrevida do enxerto (CLAAS *et al.*, 2004).

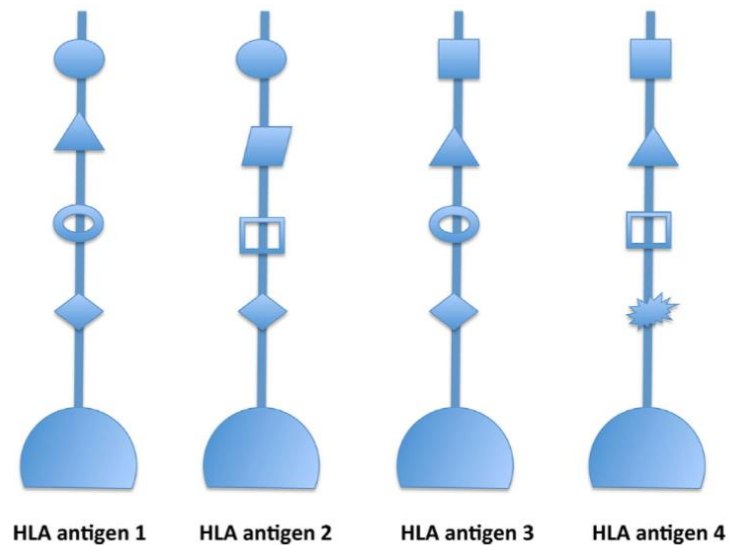
As estruturas moleculares responsáveis pela interação com os receptores de linfócitos T e B e/ou interação com anticorpo pré-formado são denominadas de epítomos estruturais. Os epítomos estruturais que interagem com os receptores de linfócitos B foram preditos por René Duquesnoy em 2001 e validados no programa do Eurotransplante com soro de candidatos a transplante sensibilizados para moléculas HLA (DUQUESNOY; MARRARI, 2002). A seguir mostrou-se que esses epítomos estruturais têm estrutura tridimensional e são compostos por um conjunto de 15 a 25 aminoácidos em uma área de 700Å que interagem com as três regiões hipervariáveis do anticorpo, denominadas de regiões determinantes de complementaridade 1, 2 e 3. A região CDR3 se liga a um conjunto de 2 a 5 aminoácidos distantes 3Å entre si e garante a especificidade do anticorpo. As regiões CDR 1 e 2 interagem com os demais aminoácidos do conjunto e garantem a afinidade da ligação. Assim, René Duquesnoy denominou de eplet o conjunto de resíduos do epítomo estrutural que interagem com a alça CDR 3 e os demais nomeou de epítomos estruturais (DUQUESNOY R. J. *et al.*, 2005). Partindo do epítomo com um raio de 15Å fez a predição dos demais aminoácidos e os descreveu em planilhas Excel.

² Em vertebrados, as reações imunitárias celulares são controladas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) para receptores de células T. Em humanos, o MHC é chamado Antígeno Leucocitário Humano (HLA).

A abordagem considerando “*mismatches*” aceitáveis só se tornou possível após o desenvolvimento do software HLAMatchmaker – o primeiro algoritmo a facilitar a análise da compatibilidade epitópica (CLAAS *et al.*, 2004; DUQUESNOY; MARRARI, 2009). O funcionamento do algoritmo baseia-se na assunção de duas premissas: (1) cada antígeno HLA é visto como um cordão de epítomos estruturais bem definidos, potencialmente imunogênicos e capazes de serem reconhecidos por anticorpos específicos; (2) o receptor é incapaz de produzir imunoglobulinas contra epítomos que constituem sua própria molécula HLA (DUQUESNOY, 2008).

Assim, ao contrário de se buscar uma combinação perfeita entre doador e receptor, no conceito de “mismatch” aceitável, embora não haja identidade total, as regiões HLA do doador que são passíveis de reconhecimento pelo sistema imune do receptor são compartilhadas e não são capazes de ativar uma resposta imune, logo são moléculas adequadas para o transplante. Isso se tornou evidente devido ao fato de que cada antígeno HLA tem a sua própria combinação única de epítomos mas, ao mesmo tempo, muitos destes epítomos são compartilhados com alguns outros antígenos HLA. A Figura 1, extraída de (TAMBUR; CLAAS, 2015), fornece um exemplo no qual o antígeno 1 compartilha o "epítomo círculo" com o antígeno 2; o "epítomo triângulo" com antígenos 3 e 4; o "epítomo donut" com o antígeno 3; e o "epítomo losango" com os antígenos 2 e 3. Assim, enquanto todos os 4 epítomos são expressos em mais do que um antígeno, a combinação única de todos os 4 epítomos está presente apenas no antígeno 1.

Figura 1: Um antígeno HLA pode ser constituído por um conjunto único de epítomos, mas os epítomos individuais são frequentemente compartilhados com outros alelos HLA.



Fonte: (TAMBUR; CLAAS, 2015)

Na prática: “*mismatches*” contendo epítomos altamente imunogênicos devem ser evitados, ao passo que aqueles com epítomos compartilhados ou fracamente imunogênicos podem ser aceitos (DUQUESNOY, 2008). Assim, avaliar a viabilidade de se substituir a compatibilidade de alelos pela de epítomos na busca por doadores aceitáveis para pacientes hipersensibilizados torna-se interessante, pois pode aumentar o número de transplantes nesse grupo de receptores mantendo segurança e garantindo a boa sobrevida do enxerto.

No entanto, o processo de análise de compatibilidade em nível epitópico é complexo e manual, carecendo de profissionais capacitados para realizá-la - o que torna o mapeamento em laboratório lento e caro (DHAR; ZHU; MISHRA, 2004). Assim, estuda-se nesse trabalho a utilização de ferramentas de inteligência artificial com a finalidade de automatizar e acelerar o processo de análise da reatividade epitópica.

2.2 SISTEMAS ESPECIALISTAS

O projeto de sistemas que modelam explicitamente algum aspecto do desempenho humano tem sido um campo fértil de pesquisa na área de Inteligência Artificial (IA). IA é o ramo da Ciência da Computação que se ocupa da automação do comportamento inteligente (LUGER, 2013). Nesta citação, Luger (2013) enfatiza com convicção que a IA faz parte da Ciência da Computação e que desse modo, deve ser baseada em princípios teóricos e aplicados solidamente nesse campo. Esses princípios incluem as estruturas de dados usadas na representação do conhecimento, os algoritmos necessários para aplicar esse conhecimento e as linguagens e técnicas de programação usadas em sua implementação. Entretanto a IA se fundamenta em diversas áreas do conhecimento, como: neurociência, filosofia, engenharia, dentre outras.

Uma das áreas de abrangência da IA refere-se aos Sistemas Especialistas (SE), que são programas especializados numa área delimitada do conhecimento. Os SEs foram desenvolvidos pela comunidade de IA em meados da década de 1960. A idéia básica que há por trás de um SE é a transferência da perícia, que é o vasto conhecimento específico sobre uma determinada tarefa, de um ser humano para um computador. Este conhecimento é então armazenado nesses sistemas que os usuários utilizam para obter uma orientação específica, conforme a necessidade. O sistema especialista deve fazer inferências e chegar a uma conclusão que imita o comportamento humano. Então, assim como um especialista humano, infere e explica, se for necessário, a lógica que há por trás dos seus resultados, auxiliando na resolução de problemas, na difusão do conhecimento, no treinamento de pessoas, dentre outras aplicações (TURBAN; ARONSON; LIANG, 2005). Os SEs tratam, em sua maioria, de problemas específicos e complexos (LIAO, 2005).

De acordo com Russel e Norvig (2010), os fundamentos dos SEs estão baseados na possibilidade de processar o conhecimento obtido de especialistas humanos, estruturado na forma de regras lógicas (processo denominado como realização de inferências), a fim de resolver problemas de forma total ou parcial de algum domínio específico, tais como: diagnóstico, interpretação, predição e outras que demandem processos dedutivos, baseados em regras positivas e hierárquicas (RUSSELL; NORVIG; DAVIS, 2010).

A arquitetura de um SE pode ser resumida em quatro partes principais: a) a Base de Conhecimento, que contém os fatos e as regras, ou seja, o que se sabe sobre o domínio do

problema e as relações lógicas entre os fatos; b) Motor de Inferência, que é o núcleo do sistema especialista que realiza o processamento dos fatos e regras fornecidos por meio da Interface com o Usuário, deriva conclusões, interpreta-as, realiza consistência das inferências; c) A Interface com o Usuário, que é o elemento do SE que permite a interação com o usuário, por meio da qual ele informa ao SE para que realize os processos de inferência e, por fim, d) o Módulo de Explicação que demonstra a linha de inferência desenvolvida pelo sistema.

No que se refere à construção dos SE, o conhecimento é algo que pode ser representado por meio de processos de codificação e as formas de atuação inteligente podem ser representadas com apoio, principalmente, da lógica para a manipulação deste conhecimento. Esta visão pressupõe que tarefas realizadas pela mente humana, como a dedução e inferência podem ser reproduzidas computacionalmente, por meio de formas racionais de processamento do conhecimento, seguindo padrões lógicos. Assim, o tratamento do conhecimento do domínio do problema é algo essencial na construção de aplicações computacionais nesta área, tal como afirmam Turban e Frenzel (1992) ao enunciar que:

a manifestação inteligente pressupõe aquisição, armazenamento, inferência de conhecimento e, também, para que o conhecimento possa ser armazenado, é essencial que se possa representá-lo (EFRAIM TURBAN, 1992, p.115).

A parte fundamental para a construção de um SE está ligada à aquisição do conhecimento com o qual se pretende trabalhar. Grandes esforços na área de IA têm sido concentrados em aperfeiçoar formalismos para representar esse conhecimento, e os estudos sobre representação do conhecimento estão, em boa parte, ligados à hipótese de Smith (1982, p.15) enunciada na forma a seguir:

Qualquer processo inteligente incorporado mecanicamente [computacionalmente] deverá consistir de elementos estruturais que: a) tenha uma descrição proposicional do conhecimento exibido pelo processo; b) independentemente de uma semântica externamente atribuída, exerça um papel formal, causal e essencial na geração do comportamento que manifesta tal conhecimento (Smith (1982, p.15) *apud* (RIBEIRO JUNIOR, 2010)) .

2.2.1 Aquisição do Conhecimento

A importância do conhecimento específico de um domínio é uma das mais importantes conclusões retiradas dos trabalhos iniciais em solução de problemas. Um médico, por exemplo, não é efetivo em diagnosticar uma doença apenas porque ele possui uma habilidade inata em resolver problemas genéricos; ele é eficaz porque sabe o suficiente sobre sua área de atuação. Da mesma forma, um geólogo é eficaz em descobrir depósitos de minérios porque ele é capaz de aplicar uma grande quantidade de conhecimentos teóricos e empíricos sobre geologia ao problema específico. O conhecimento especialista é uma combinação de um entendimento teórico do problema com uma coleção de regras heurísticas para resolver esses problemas, que a experiência demonstrou ser efetiva no domínio (LUGER, 2013).

Para que o conhecimento possa efetivamente ser utilizado na construção de um SE, é necessário que este seja extraído e transferido de algum recurso humano para uma base de conhecimento. Este processo de extração e transferência é denominado de aquisição do conhecimento ou elicitação do conhecimento. A Aquisição do Conhecimento (AC) envolve três pontos fundamentais: (1) aplicação de uma técnica para elicitar os dados de um especialista, (2) interpretação dos dados para reconhecer o conhecimento implícito e (3) construção de um modelo de representação do conhecimento (JERZY, 1991). O conhecimento é introduzido por etapas, assim, a cada nova interação para aquisição de mais conhecimento, é esperada uma melhora no desempenho do sistema especialista. Contudo, o termo “aquisição de conhecimento” tem um sentido mais amplo que o de elicitação, segundo Buchanan & Shortliffe³ (1983 *apud* (REZENDE, 2005)):

Aquisição do conhecimento é a transferência e transformação do conhecimento especializado com potencial para resolução de problemas de alguma fonte de conhecimento para um programa.

Esta citação demonstra neutralidade quanto às formas de aquisição do conhecimento, sem especificar nenhuma. Muitos esforços têm sido feitos para sistematizar o processo de aquisição. Estes esforços resultaram em várias técnicas. Essas técnicas podem ser classificadas em manuais, semiautomáticas e automáticas. As técnicas manuais são as mais

³ Buchanan, B.; Shortliffe, E. **Rule-Based expert systems: The MYCIN experiments of the Stanford Heuristic programming project**. Addison-Wesley Longman Publishing Co., 1984.

utilizadas, as semiautomáticas geralmente são utilizadas em conjunto com as técnicas manuais, já as técnicas automáticas dizem respeito ao processo pelo qual o conhecimento é adquirido automaticamente, ou seja, sem a interferência humana ou com pouca interferência. As técnicas automáticas são uma área vasta a ser explorada e não entraram no escopo desse trabalho (COSTA; SILVA, 2005). Como exemplo de AC automática tem-se a mineração de dados e o aprendizado de máquina (redes neurais, árvores de decisões, entre outros).

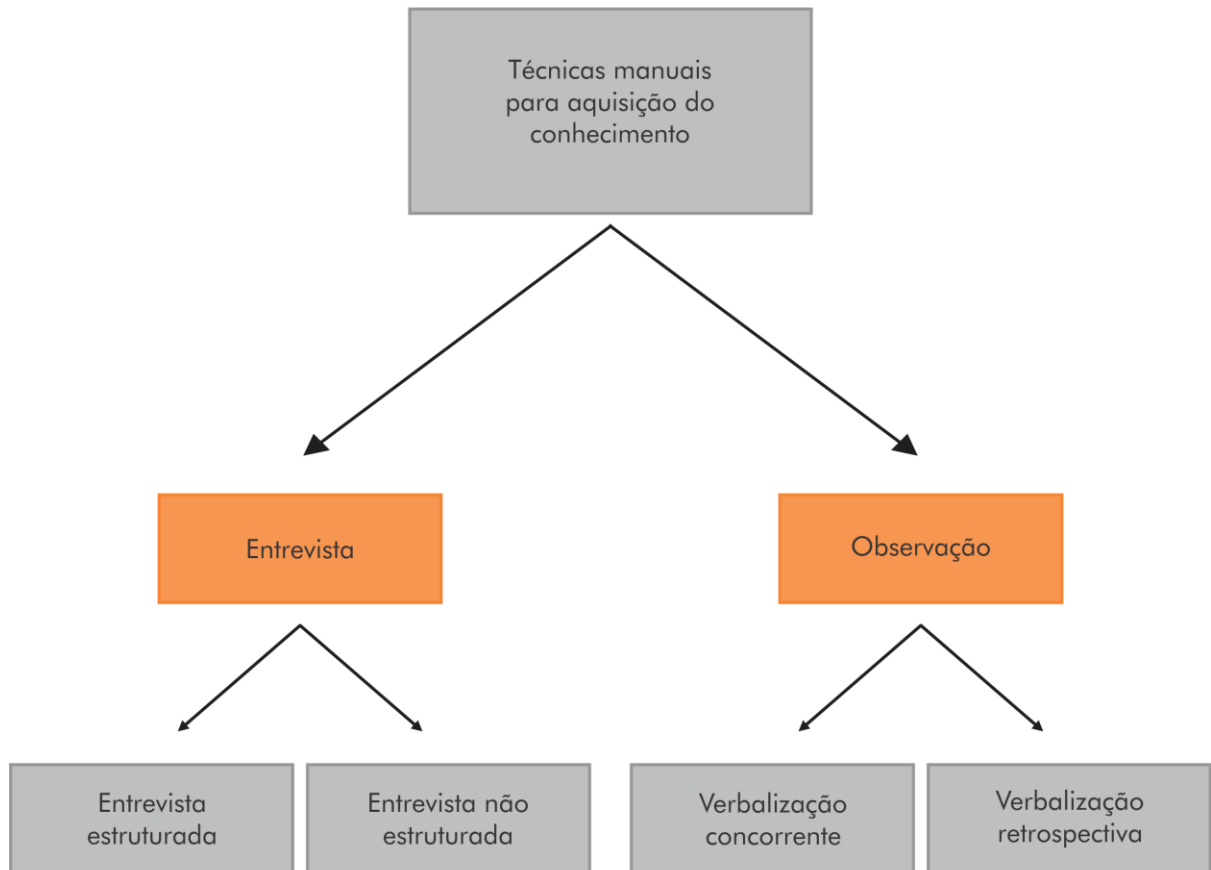
O processo de AC inicia-se com a apropriação do conhecimento disponível em fonte documentada. As fontes documentadas mais utilizadas são: livros, filmes, gráficos, diagramas, manuais, entre outras. Já as fontes não documentadas residem na mente das pessoas que atuam no domínio de aplicação do sistema (especialistas que detêm o conhecimento que se quer armazenar no SE). □Ao utilizar fontes documentadas, o engenheiro de conhecimento (indivíduo responsável pelo desenvolvimento do SE) esbarra na dificuldade relativa a ter que conhecer o domínio do problema para poder compreender o conteúdo da documentação, por exemplo, não é possível para um leigo, adquirir um livro de cardiologia e conseguir extrair conhecimentos importantes.

Assim, o engenheiro de conhecimento acaba tendo que recorrer aos agentes do domínio, os quais são pessoas que trabalham diretamente com o assunto em questão. Mas, em quase todos os domínios, há um agente que se destaca por desenvolver métodos particulares e eficientes de lidar com os problemas e ainda por possuir um conhecimento profundo sobre o assunto. Esse agente é o especialista. Especialistas desenvolvem estruturas de armazenamento de informações particulares que são mais enxutas e eficazes para lidar com informações de um domínio específico. Dessa maneira, um especialista é a melhor fonte de informações para um processo de AC.

Uma vez adquirido o vínculo com o especialista, dá-se início a aplicação das técnicas de aquisição manuais. As técnicas manuais mais utilizadas são: (1) entrevistas formais e (2) observações feitas do especialista no seu ambiente de trabalho (Figura 2). Na primeira técnica, o engenheiro de conhecimento elicit o conhecimento por meio de perguntas diretas sobre o raciocínio lógico que o especialista emprega na execução da tarefa a ser informatizada. A segunda técnica caracteriza-se pelo trabalho passivo do engenheiro de conhecimento, que deve observar o especialista em ação. É importante salientar que, antes de fazer uso dessas técnicas clássicas para extração do conhecimento do especialista, um rigoroso plano de estudo foi executado com o propósito de conhecer os conceitos utilizados no domínio do problema,

devido à multidisciplinaridade envolvida nessa proposta de desenvolvimento. Este protocolo de estudo está no capítulo 3 “Metodologia”.

Figura 2: Técnicas manuais para aquisição do conhecimento.



Fonte: A autora (2016).

2.2.1.1 Entrevistas

O roteiro das sessões de entrevista é definido pelo engenheiro de conhecimento com base nos seus primeiros estudos sobre o domínio do problema. Normalmente, as primeiras sessões não possuem uma estrutura bem estabelecida. O(s) especialista(s) discursa(m) livremente sobre o assunto e o interlocutor intervém com questões de âmbito geral. Em um segundo momento as entrevistas devem ser mais estruturadas, desta forma, o engenheiro de conhecimento propõe questões específicas previamente elaboradas visando dirimir dúvidas e aprofundar os principais pontos elencados nas primeiras sessões (Figura 2). Os registros podem ser feitos por meio de anotações e gravações em áudio e vídeo.

2.2.1.2 Observação

Alguns especialistas podem não conseguir expressar seu conhecimento de maneira explícita, ou talvez tenham alguma dificuldade em fazê-lo. Nesses casos é mais proveitoso combinar as técnicas de entrevista com observações do especialista (por parte do engenheiro do conhecimento) inserido no seu ambiente de trabalho. Para Costa e Silva (2005, p.42), “algumas estratégias de resolução de problemas usadas por especialistas estão tão arraigadas na mente desses profissionais que só são ativadas em situações reais de aplicação de um trabalho, por isso elas quase sempre não são transmitidas para os engenheiros de conhecimento nas entrevistas.”

A técnica de observar o especialista caracteriza-se por dois tipos de protocolo: a verbalização concorrente que pode ser dos tipos *talk aloud* e/ou *think aloud* e a verbalização retrospectiva ou retrospecção. Uma das técnicas mais utilizadas é a *think aloud*, que consiste em solicitar ao especialista que verbalize o seu processo de raciocínio durante a execução das tarefas rotineiras que deverão ser automatizadas. Deste modo o engenheiro de conhecimento pode observar o percurso cognitivo empregado pelo especialista na resolução de um dado problema e como sua estratégia de raciocínio foi formulada e executada passo a passo. Nesta modalidade é interessante que o especialista no assunto não seja interrompido.

No caso do método de retrospecção, ou verbalização retrospectiva, o especialista resolve um problema e é questionado sobre seu processo de pensamento após a realização deste. É possível, neste caso, gravar a sessão de solução do problema em vídeo e revê-lo juntamente com o especialista a fim de interpretar o que realmente aconteceu ao visualizar as imagens com o desempenho de sua tarefa (VAN SOMEREN, M.W., BARNARD AND Y.F., SANDBERG, 1994).

2.2.2 Representação do Conhecimento

O especialista humano, ao trabalhar em sua área, opera em um domínio de conhecimento, de habilidades e práticas. Esse conhecimento pode ser, muitas vezes vago, impreciso do ponto de vista probabilístico e parcialmente verbalizado. O engenheiro do conhecimento deve traduzir essa especialidade informal em uma linguagem formal adequada para um sistema de computação. Nesse processo algumas dificuldades inerentes ao método merecem ser destacadas:

- Descrever exatamente o que fazem ao resolver um problema é uma tarefa difícil para um especialista. A habilidade humana é, muitas vezes, inacessível à mente consciente (LUGER, 2013). Não há, no escopo desse trabalho, um protocolo oficial que defina como fazer uma análise epitépica, por onde se inicia ou o que deve ser contemplado ao final. Muito do que o especialista em análise da reatividade epitépica faz é oriundo de habilidades aprendidas ao longo de anos desempenhando essa tarefa, orientadas pela prática com o embasamento teórico que eles detêm sobre imunologia do transplante. Após anos de atuação, essas habilidades se tornam altamente integradas e funcionam em um nível inconsciente, o que pode dificultar a descrição efetiva do processo de ação para executar uma análise assertiva. Há ainda o fato de que algumas pessoas sentem-se avaliadas no processo de entrevistas e acabam omitindo algumas informações importantes para a construção do SE.
- A especialidade humana muitas vezes assume a forma de **como** agir em uma situação, em vez de **o que** caracteriza racionalmente uma situação, no sentido de desenvolver mecanismos para a atuação de perícia, em vez de compreender o que são esses mecanismos. Trazendo esta afirmativa para o problema em questão, percebeu-se que o processo de realização da análise da reatividade epitépica é muito subjetivo no que se refere aos caminhos que levam o especialista ao final da análise. Pela ausência de uma conduta padrão, o especialista em análise epitépica não percorre sempre o mesmo caminho para chegar ao final de uma análise, ou seja, não resolve conscientemente uma sequência de passos lógicos que lhe garantam a melhor solução. Ao invés disso, ele usa uma combinação intuitiva de estratégias pré-definidas de ação somadas ao que sua experiência mostrou ser efetivo para formar um solução viável.

- O conhecimento se modifica. Não apenas os especialistas ganham novos conhecimentos como também o conhecimento existente pode estar sujeito a reformulações, como se pode verificar nas constantes controvérsias na área da saúde. No que se refere à análise da reatividade epitópica, o personagem principal, que é o epítopo, possui um banco de dados internacional (Eprestry) e disponível em <http://www.epregistry.com.br>, desenvolvido pelo LIB, denominado EpRegistry, contendo todo o repertório de epítotos HLA preditos por Rene Duquesnoy (DUQUESNOY *et al.*, 2013, 2014). Esses dados são a base para a análise de reatividade epitópica do soro dos pacientes em lista de espera no programa EpViX e estão em constante atualização, ou seja, o epítoto será, ou não, valorizado na análise da reatividade epitópica de acordo com o seu status no EpRegistry. A classificação dos epítotos quanto ao seu *status* será tratada na seção referente ao protocolo de estudos.
- Especialistas são profissionais extremamente valiosos e requisitados em uma empresa, assim, é bastante difícil tê-los comprometidos plenamente com o desenvolvimento de um SE.

Apesar das dificuldades inerentes ao processo de formalização do conhecimento do especialista humano, em muitas áreas a resolução de problemas não exige que se reporte sistematicamente o conhecimento mais fundamental. A solução é muitas vezes obtida a partir do reconhecimento de padrões. Tudo se passa como se o especialista obedecesse a certas regras, cujas validades foram estabelecidas por meio de uso prático constante. Conhecida regra em diagnóstico médico é: **se febre então infecção**, possivelmente acompanhada de algum fator de certeza estabelecendo seu grau de validade para o contexto particular. Regras dessa natureza não se reportam a conhecimento mais básico para chegar a uma conclusão. Um profissional de medicina não se reporta sistematicamente aos processos bioquímicos desencadeadores da febre para uma conclusão do tipo estabelecido por essa regra. Diz-se encerrar a regra conhecimento compilado, assumindo a forma de associações diretas entre sintomas observáveis e diagnóstico final, e ocultando suas fundamentações explanatórias mais aprofundadas.

A resolução de problemas baseada em conhecimento compilado pode ser automatizada com alguma facilidade. Uma vez extraído, o conhecimento de especialistas converte-se usualmente em regras do tipo *SE <condição> ENTÃO <conclusões e ações>* (NEGNEVITSKY, 2002). Essa abordagem é uma das técnicas mais antigas para representar o

conhecimento do domínio em um SE. É também uma das mais naturais e permanece amplamente usada em SEs práticos e experimentais. Estabelecidas as regras, é necessário verificar sua ordem de aplicação para determinada situação-problema.

De modo geral, tenta-se fazer cada regra representar uma unidade de raciocínio isolada. Porém, deve-se levar em conta poder certa regra estabelecer conclusões parciais que acionem não uma, mas várias outras regras em seguida. A prática mostra que o engenheiro do conhecimento também precisa organizar o conhecimento para conseguir conviver com o volume de informações que precisa codificar (ZWICKER; REINHARD, 1990). Assim, o meta-conhecimento acaba sendo incorporado nesses sistemas.

Ao final do processo manual de aquisição do conhecimento, algum tipo de rotina de revisão deve ser implantada para averiguar a consistência do conhecimento capturado.

2.2.3 Sistemas especialistas em saúde

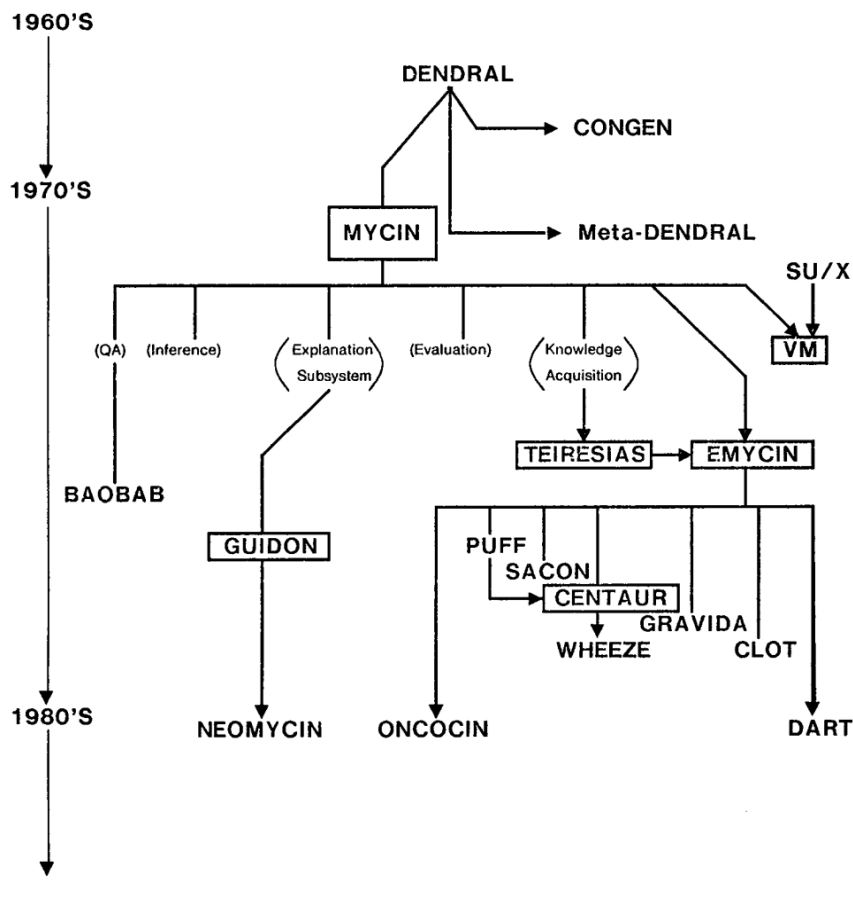
Esta subseção contempla a revisão da literatura sobre o desenvolvimento de SEs para a área da saúde, desde o DENDRAL (Lindsay *et al.*⁴, (1980) *apud* (LUGER, 2013)) – primeiro sistema especialista a alcançar notoriedade – até as aplicações desenvolvidas nos dias atuais. Por meio destes trabalhos, pode-se visualizar muitas das questões importantes que foram sendo investigadas para o desenvolvimento do EpAssistant.

Um dos sistemas mais antigos a explorar o conhecimento específico do domínio para a solução de problemas foi o DENDRAL, desenvolvido em Stanford no final dos anos 60. Este sistema foi projetado para inferir a estrutura de moléculas orgânicas a partir de suas fórmulas químicas. Como as moléculas orgânicas normalmente são muito grandes, o número de estruturas possíveis para essas moléculas tende a ser enorme. O DENDRAL tratava o problema desse grande espaço de busca aplicando o conhecimento heurístico de especialista em química no problema de elucidação da estrutura. O método utilizado mostrou-se eficaz, obtendo rotineiramente a estrutura correta entre milhões de possibilidades após algumas tentativas. Sistemas posteriores (Figura 3) também incorporaram o principal tema da proposta do programa DENDRAL - *Advice Taker McCarthy* – a clara separação do conhecimento (na

⁴ LINDSAY, R. K. et al. Applications of artificial intelligence for organic chemistry: the DENDRAL project. Nova York: McGraw-Hill, 1990.

forma de regras) do componente de raciocínio (RUSSELL; NORVIG; DAVIS, 2010). Essa abordagem se mostrou tão bem sucedida que hoje em dia são usados programas descendentes e extensões desse sistema em laboratórios químicos e farmacêuticos em todo o mundo.

Figura 3: Projetos de programação heurística inspirados no dendral. Os programas cujos nomes estão dentro de caixas foram produtos de teses de doutorado.



Fonte: (BUCHANAN; SHORTLIFFE, 1962).

Enquanto o DENDRAL foi um dos primeiros programas a usar efetivamente o conhecimento específico do domínio para alcançar o desempenho de especialistas na resolução do problema, o MYCIN, também desenvolvido na Universidade de Stanford, estabeleceu a metodologia dos sistemas especialistas contemporâneos para a seleção de antibióticos em pacientes com infecção severa (SHORTLIFFE, 1986). O MYCIN utiliza

conhecimentos de especialistas médicos para diagnosticar e prescrever tratamentos para meningite espinhal e infecções bacterianas do sangue. Ele fornecia explicações lógicas claras do seu próprio raciocínio e identificava critérios para avaliar o desempenho obtido de forma confiável. O MYCIN foi um dos primeiros programas a tratar os problemas do raciocínio com informações incertas ou incompletas e sua relevância no contexto histórico está no fato de que muitas técnicas de desenvolvimento de sistemas especialistas em uso atualmente foram desenvolvidas originalmente no projeto MYCIN (LUGER, 2013). Uma revisão esquemática da história de trabalho do MYCIN e projetos relacionados pode ser visualizada na Figura 3.

Os sistemas especialistas de diagnóstico em saúde dividiram-se, em sua fase inicial, em dois tipos: a) sistemas baseados em regras; b) sistemas baseados em reconhecimento de padrões. A maioria dos esforços iniciais, no sentido de aplicar técnicas de inteligência artificial na resolução de problemas reais na área da saúde, fundamentaram-se em sistemas baseados em regras (SHORTLIFFE, 1986). Como foi explanado no item anterior deste trabalho, tais programas são relativamente fáceis de criar, porque seu conhecimento é catalogado na forma de regras do tipo *If...Then...* e utilizadas em forma de cadeia com o objetivo de atingir uma conclusão. Este tipo de programa consegue parecer inteligente, permitindo também o uso das chamadas “árvores de decisão”, muito frequentes nos sistemas médicos modernos, que tomam como entrada uma situação descrita por um conjunto de atributos e retornam uma **decisão**, que é o valor predito para o valor de entrada. Em áreas de domínio limitado, tais programas têm se mostrado bastante efetivos (DUDA; SHORTLIFFE, 1983).

Segundo Slozovitz, Patil e Schwartz (1988)⁵ *apud* (ANDRADE, 1999), o problema dos sistemas baseados em regras é que em áreas mais complexas, como o diagnóstico em Medicina, o domínio do conhecimento é, de tal forma extenso, que torna sua implementação extremamente difícil. Apesar da mais que evidente utilidade desses sistemas em programas médicos baseados em árvores de decisão, a principal limitação ao seu uso advém da dificuldade de aceitar condutas de um computador que ponham em risco vidas humanas. Em face da dificuldade de aplicar sistemas baseados em regras em áreas de domínio extenso, a solução pareceria estar em programas tipo reconhecimento de padrões (*pattern matching systems*). Ao nível mais elementar, tais programas funcionam da seguinte maneira: (1) determina-se um achado (sintoma, sinal ou exame complementar) apresentado pelo paciente,

⁵ Slozovitz P, Patil R, Schwartz WB. Artificial intelligence in medical diagnosis. *Ann Intern Med* 1988; 108: 80-7.

que pode estar relacionado à doença, para cada possível hipótese diagnóstica; (2) estabelecem-se escores para cada doença de acordo com o número de achados que ela apresenta em comum com o paciente; (3) ordenam-se as doenças de acordo com os escores obtidos; (4) pergunta-se se achados pertencentes à base de dados da doença com maior pontuação e não listados no caso encontram-se presentes no paciente; (5) repete-se a análise (1 e 2); (6) repete-se o procedimento na(s) doença(s) seguintes (3 e 4) (ANDRADE, 1999).

Se um programa tipo reconhecimento de padrões for desenvolvido dentro desta forma simplista, ele se assemelhará à maneira como muitos iniciantes abordam o processo de diagnóstico. Em consequência, falhará por não levar em conta os seguintes fatores: a) quão fortemente a presença de um achado (sintoma, sinal ou exame complementar) lembra uma determinada doença?; b) quão fortemente a ausência de um achado afasta a possibilidade de uma doença?; c) qual a prevalência de cada uma das hipóteses na população estudada?; d) quão fortemente um achado presente no paciente e não presente na hipótese afasta o diagnóstico?; e) o doente apresenta apenas uma ou mais de uma doença? f) se houver mais de uma doença, estarão elas relacionadas?

Considera-se que o médico experiente, dispondo de uma forte base de conhecimentos em sua mente, emprega com competência estas informações ao longo do processo diagnóstico, sendo esta uma das características que o separa dos iniciantes (ANDRADE, 1999). Por isso mesmo, alguns dos programas de computador mais conhecidos na área de diagnóstico, como o Internist (MILLER; POPLE; MYERS, 1982), sua variante QMR (MILLER *et al.*, 1986), o DX Plain (BARNETT *et al.*, 1987) e o Iliad (WARNER, 1989) incorporam a um programa tipo reconhecimento de padrões, aspectos de raciocínio probabilístico e, no caso do Internist, de encadeamento causal. Para que sistemas especialistas deste tipo sejam melhor entendidos é necessário discutir mais detalhadamente os fundamentos lógicos do processo de diagnóstico, que não compreende o foco desta pesquisa.

Desde o surgimento do MYCIN, os SEs têm representado um campo fértil de pesquisa e desenvolvimento na área da saúde, especialmente no apoio ao diagnóstico em medicina, nas mais diversas patologias. Entre as pesquisas mais recentes utilizadas como referencial teórico neste trabalho destacam-se, por exemplo, um Sistema Baseado em Conhecimento para auxílio ao diagnóstico do Alzheimer (SANCHEZ *et al.*, 2011) e um SE para apoiar a decisão na terapia de úlceras venosas (SELLMER *et al.*, 2013). Outros modelos

de aplicação baseados em conhecimento voltados ao telemonitoramento de pacientes também foram relevantes para realização desta proposta. Chen et al. (2012) integram um modelo de raciocínio baseado em regras de conhecimento flexíveis para determinar de forma eficiente e rápida os procedimentos para o tratamento fisiológico e indicação de medicamentos em um sistema de *Home Care* (CHEN *et al.*, 2012). Em Seto, 2012 (SETO *et al.*, 2012) relata-se um sistema de telemonitorização da insuficiência cardíaca que, segundo os autores, resultou em um aumento significativo do autocuidado e melhorou a gestão clínica de insuficiência cardíaca.

Contudo, apesar da diversidade de aplicações de sistemas especialistas para a área da saúde, atendendo às mais variadas especialidades e problemas, não há nenhuma solução baseada em SEs na histocompatibilidade que consolidasse o objetivo geral aqui proposto. Assim, apresenta-se adiante os métodos utilizados no desenvolvimento desse sistema especialista facilitador da identificação da especificidade epitópica do anticorpo anti –hla pré-formado em soro de candidatos a transplante de órgãos e tecidos, bem como seus resultados e expectativas futuras.

PÁGINAS SUPRIMIDAS

39 a 51

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresenta-se, por meio de casos de uso específicos, os resultados obtidos com o uso da ferramenta EpAssistant, ao passo que são confrontados com os resultados obtidos nas análises manuais.

4.1 CASO PSA CLASSE I – ANÁLISE TOTALMENTE CONCORDANTE

A **Figura 8** mostra a análise de um painel Classe I (lócus A, B e C) sendo elaborada no software EpViX. A aba “Inaceitáveis” está ativa filtrando apenas os epítomos reativos para o dado *cut off*. O especialista inicia a análise do PSA procurando os epítomos que justificam a reatividade do painel. A cada epítomo selecionado pelo especialista é atribuída uma cor que o destaca e o difere dos demais, facilitando a percepção visual quanto a prevalência do epítomo em todo o painel. Os epítomos que aparecem destacados em retângulos coloridos foram os escolhidos pelo especialista como responsáveis pela reatividade deste painel. Ao clicar no botão “*Analyse with EpAssistant*” (Figura 8A), a ferramenta é acionada e o usuário visualizará a interface do EpAssistant, mostrada na Figura 9.

Figura 8: Trecho de um PSA classe I com análise epitópica feita pelo especialista humano a partir do software EpViX.

ALELO	MFI	EPLETS
A*24:02	14777	62EE 65GK 66KAH 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138M 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A 127K 144KR+127K 151AHV 163TG 166DG
A*23:01	14127	62EE 65GK 66KAH 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138M 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A 127K 163TG 166DG
A*01:01	12102	44KJ ₁ 66NM 163RG 166DG
B*07:01	10958	70IAQ
A*24:03	10293	62EE 65GK 66KAH 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138M 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A 127K 144KR+127K 151AHV
B*55:01	9893	70IAQ
B*42:01	9739	70IAQ
B*15:12	9081	163LG 166DG
A*32:01	8115	65RNA+s80I 76ESI 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138M 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A
B*57:03	5851	62GE 62GRN 65RNA+s80I 66NM 71SA 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A 97V
B*59:01	5723	71TTN 76ENI 76ENR 80I 80I+65QI 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A
B*57:01	5802	62GE 62GRN 65RNA+s80I 66NM 71SA 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A 97V
A*80:01	5271	56E4 62EE 166DG
B*38:01	5195	71TTN 76ENI 76ENR 80I 80I+65QI 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A
A*02:03	5078	62GE 62GK ₁ 66KAH 94TV 107W 127K 144TKH 145HT
A*88:02	4958	115M 127K 144TKH 145KHA 151AHV 245VA
B*58:01	4814	62GE 62GRN 65RNA+s80I 66NM 71SA 76ENI 76ENR 80I 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A
A*02:01	4899	62GE 62GK ₁ 66KAH 94TV 107W 127K 144TKH 145KHA 151AHV
B*49:01	4495	71TTN 76ENI 76ENI+62RE 76ENR 80I 80I+152RE 80I+65QI 80I+90A 81ALR 82LR 82LR+138T 82LR+144Q145R 82LR+145R 82LR+90A 82LR+s145R/149A
A*88:01	4429	127K 144TKH 145KHA 151AHV 245VA
A*89:01	4410	94TV 107W 127K 144TKH 145KHA 151AHV

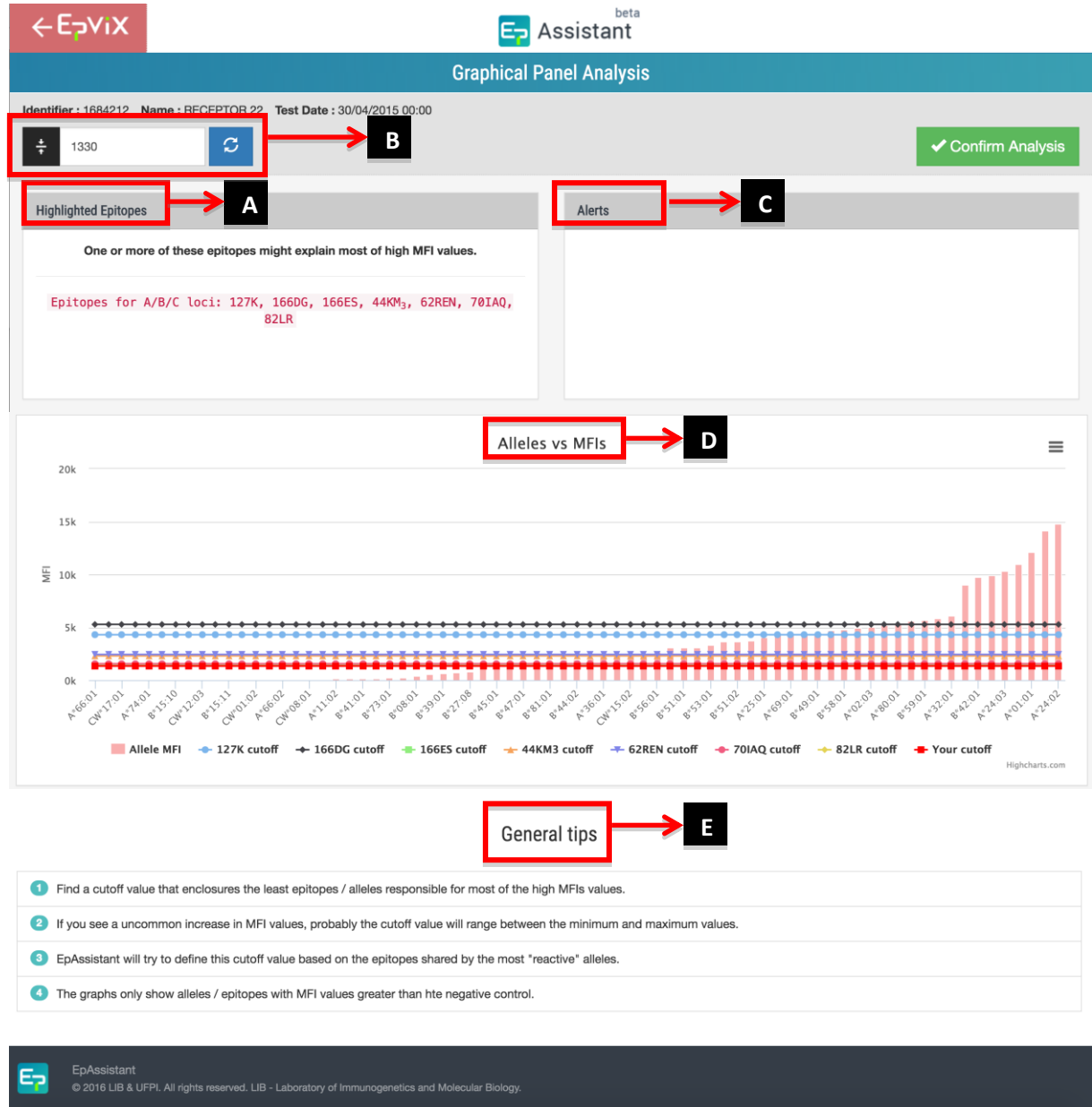
Fonte: A autora (2016).

A Figura 9 mostra a interface com o usuário do EpAssistant na qual se pode visualizar no espaço, “*Highlighted Epitopes*” (Figura 9A), o resultado da análise epitópica automática com os epítomos causadores da reatividade para o painel da Figura 8, entre outros dados importantes que serão destacados a seguir. Cinco pontos principais merecem ser salientados na interface do EpAssistant: a Figura 8B mostra o campo para alteração do *cut off* atual da análise, a cada novo *cut off* inserido pelo analista manual, a ferramenta refaz a análise e mostra os resultados em Figura 9A, “*Highlighted Epitopes*”. “*Alerts*” (Figura 9C) mostram as possíveis inconsistências resultantes da escolha do *cut off* atual e alertam o usuário sobre os ajustes que poderão ser feitos. Em Figura 9D, “*Alleles vs MFIs*”, tem-se uma alternativa de visualização gráfica ao PSA, um gráfico dinâmico, que varia de acordo com o valor do *cut off*

digitado, e que relaciona Alelos X MFI X Epítapos. Com base no gráfico, o especialista pode facilmente perceber quando há um aumento incomum nos valores do MFI (barras vermelhas verticais), apenas observando-o. Isto pode sinalizar que o *cut off* ideal está próximo a esta faixa de aumento. Por fim, dicas básicas para se iniciar uma análise epitópica são apresentadas no espaço “*General tips*” (Figura 9E)

O primeiro caso apresentado na Figura 8 é um exemplo no qual foi obtida total concordância entre o resultado da análise manual e o da análise automática, ou seja, todos os epítapos escolhidos pelo analista foram também os selecionados pela ferramenta. Também se observa que, para este caso, não há nenhum alerta no espaço “*Alerts*” da interface do EpAssistant. Isso indica para o analista manual que sua escolha de *cut off* pode estar adequada, pois, do contrário, seriam apresentados alguns alertas neste espaço, baseados no conhecimento do especialista sobre o que caracteriza uma boa análise, tais como: não restar alelos sem justificar para um dado *cut off* ou não restar alelos acima do *cut off* sem epítapos que os justifiquem. A função dos “alertas” na interface será melhor detalhada nos próximos subitens.

Figura 9: Resultados do Epassistant para o PSA da Figura 8.



Fonte: A autora (2016).

4.2 CASO PSA CLASSE II – ANÁLISE PARCIALMENTE CONCORDANTE

Na Figura 10 está a análise epitópica manual feita para um painel de Classe II (lócus - DR, -DQ e -DP). O analista manual selecionou os epítomos em destaque (lócus DR: indefinido para este painel; lócus -DQ: 52SK5, 52PQ2 e 52PR; lócus -DP: 69R2) para justificar todo o painel.

Figura 10: Trecho de um painel de classe II com análise realizada pelo especialista.

Cutoff <input type="text" value="1500"/> Analisar Analyse with EpAssistant Beta		Próprios	Todos	Inaceitáveis	Reativos
ALELO	MFI	EPLETS			
DQA1*01:02 – DQB1*06:04	14410	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 56PV 85VY 86G ₂ 125G			
DQA1*01:02 – DQB1*06:02	13957	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 55RPD 67VG 70GT 85VA 87F 125G			
DQA1*01:02 – DQB1*05:02	12902	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 56PS 67VG 74SR ₃ 74SV ₂ 85VA 85VY			
DQA1*01:01 – DQB1*06:02	12874	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 55RPD 67VG 70GT 85VA 87F 125G			
DQA1*04:01 – DQB1*04:02	12847	α: β: 52PR 55RL ₃ 74SV ₂			
DQA1*02:01 – DQB1*04:02	12655	α: β: 52PR 55RL ₃ 74SV ₂			
DQA1*03:03 – DQB1*04:01	11888	α: β: 23L 52PR 55RL ₃ 74SV ₂			
DQA1*02:01 – DQB1*04:01	11785	α: β: 23L 52PR 55RL ₃ 74SV ₂			
DQA1*01:01 – DQB1*05:01	8921	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 56PV 67VG 74SR ₃ 74SV ₂ 85VA 85VY 125SQ			
DQA1*01:03 – DQB1*06:01	8447	α: 41KA ₂ 52SK ₅ β: 3P ₄ 52PQ ₂ 52PR 55RPD 85VA 87F 125G			
DQA1*01:02 – DQB1*06:09	7980	α: 41RA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 56PV 85VY 86G ₂ 125G			
DQA1*01:03 – DQB1*06:03	5968	α: 41KA ₂ 52SK ₅ β: 52PQ ₂ 52PR 55RPD 67VG 70GT 85VA 87F 125G			
DPA1*01:03 – DPB1*11:01	11466	α: β: 69R ₂			
DPA1*01:04 – DPB1*11:01	8524	α: β: 69R ₂			

Fonte: A autora (2016).

Entretanto, na análise automática (Figura 11), o epítipo 52PQ2 não foi selecionado pela ferramenta porque os alelos nos quais ele aparece já foram justificados por outro epítipo de mesmo status e mais frequente, o 52PR. Neste caso, o algoritmo procura o menor conjunto de epítipos que justifiquem todo o painel, outro importante conhecimento repassado pelo especialista e implementado no EpAssistant.

No espaço para os alertas estão sendo destacados os alelos acima do *cut off* sem epítipos responsáveis para os loci -DQA e -DPA (Figura 11). Como sugestão, o EpAssistant recomenda que o usuário reduza o valor do *cut off* para que esses epítipos, caso existam, sejam apresentados. É possível que, em casos específicos, ao final da análise, permaneçam alelos sem reatividade justificada mesmo já estando o *cut off* em seu valor mínimo. Contudo esses casos não representam uma análise ideal. Em todas as situações, somente o especialista poderá confirmar o resultado da análise automática e a importância do EpAssistant, como ferramenta de apoio à decisão, é ressaltar quais são e onde estão as inconsistências de cada análise, caso existam.

Figura 11: Resultados do Epassistant para o PSA da Figura 10.



Fonte: A autora (2016).

4.3 CASO 3 – SIMULAÇÃO PARA DEMONSTRAR A LÓGICA IMPLEMENTADA

Nesta última demonstração do uso da ferramenta, foi feita uma simulação objetivando demonstrar a lógica utilizada nas decisões do EpAssistant e quanto o especialista poderá beneficiar-se dessa ferramenta de apoio à decisão na busca do *cut off* mais adequado para a análise da reatividade epitópica. O caso de uso demonstrado a seguir (Figura 12) é um PSA de classe I. Em um primeiro momento, iniciou-se a análise com um *cut off* de 1500 para evidenciar algumas situações que podem ocorrer durante o processo de análise epitópica.

Supondo que esta seja uma análise incompleta na qual apenas dois epítomos são escolhidos para justificar a reatividade de todo o painel: 41T e 80TLR (Figura 12), pode-se fazer os seguintes julgamentos acerca deste PSA: (1) há 4 (quatro) alelos acima do *cut off*, com epítomos reativos (epítomos pretos), onde nenhum desses epítomos foi selecionado para justificar os altos valores de MFI desses alelos, mesmo contendo epítomos com *status* “*exposed*” no EpRegistry (Figura 12A, Figura 12B); (2) o alelo B*15:12, que aparece com alta reatividade, possui apenas um epítopo responsável, 163LG, que não foi selecionado (Figura 12C); (3) o alelo B*27:08 possui epítomos reativos, mas nenhum deles foi selecionado (Figura 12D) e (4) há mais 4 (quatro) alelos acima do *cut off* com, aparentemente, nenhum epítopo responsável por esta reatividade (linhas em branco sem nenhum epítopo preto ou vermelho). A Figura 13 demonstra como a interface do EpAssistant se comportará com relação aos problemas apontados acima.

Figura 12: Simulação análise manual com *cut off* de 1500.

✓ Controle negativo: 61
✓ Controle positivo: 7593
✓ Analisado
✓ Revisado

Data do teste: 22/05/2015 00:00 (SORO ATUAL) · Migrado em: 24/09/2015 13:59 · Alteração: 08/12/2015 16:42 · Responsável: pesquisa-igen

Cutoff: 1500 Analisar Analyse with EpAssistant Beta Próprios Todos Inaceitáveis Reativos

ALELO	MFI	EPLETS
B*44:03	14981	32L 41T 45KE 80TA 80TLR 162QLS 166ES 199V
B*45:01	14834	32L 41T 45KE 162QLS 166ES
B*82:01	14615	162DLS 166ES
B*44:02	12720	32L 41T 45KE 80TA 80TLR 162QLS 166ES 199V
B*15:12	11772	163LG
B*07:02	9927	163EW+73TE 177DK
B*81:01	9488	143S+s 76ESN 163EW+73TE 177DK 245TA
B*27:05	8472	32L 71ATD 76ED 80TLR 97N 163EW+73TE
B*27:08	8050	32L 97N 163EW+73TE
B*40:01	6967	32L 41T 45KE 143S+s 76ESN 163EW+73TE 177DK
B*13:02	6815	41T 80TA 80TLR 144QL 163EW+73TE
B*47:01	6784	32L 41T 45KE 71TTD 76ED 80TLR 163EW+73TE
B*40:02	6554	32L 41T 45KE 163EW+73TE 177DK
B*13:01	6278	41T 80TA 80TLR 144QL 163EW+73TE
B*48:01	5828	143S+s 76ESN 163EW+73TE 177DK 245TA
B*42:01	5801	
B*87:01	5749	
B*40:06	5256	32L 41T 45KE 163EW+73TE 177DK
B*41:01	4509	32L 41T 45KE
B*56:01	4428	
B*55:01	4339	
B*49:01	3131	32L 41T 45KE
B*50:01	3041	32L 41T 45KE
B*37:01	2000	71TTD 76ED 80TLR

Próprio do receptor · Positivo (acima do cutoff) · Positivo (acima do cutoff) · Negativo (abaixo do cutoff) Baixar como Excel

Confirmar ✓

A

Eplet: 166ES: Exposed

INACEITÁVEL	ACEITÁVEL
<ul style="list-style-type: none"> B*44:03 - 14961 B*45:01 - 14834 B*82:01 - 14615 B*44:02 - 12720 	

Ver no EpRegistry Continuar

B

Eplet: 177DK: Exposed

INACEITÁVEL	ACEITÁVEL
<ul style="list-style-type: none"> B*07:02 - 9927 B*81:01 - 9488 B*40:01 - 6967 B*40:02 - 6554 B*48:01 - 5828 B*40:06 - 5256 	

Ver no EpRegistry Continuar

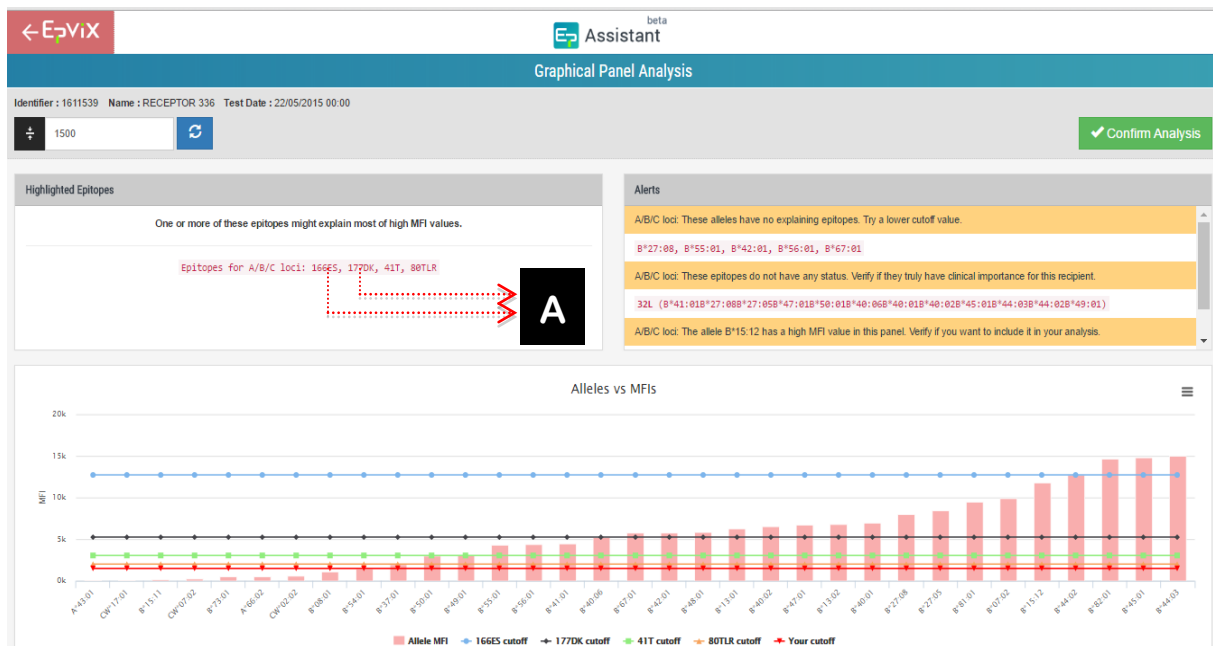
Fonte: A autora (2016).

Quando a análise automática é solicitada, a ferramenta traz como resultado, além dos epítomos previamente escolhidos na análise manual (41T e 80TLR), o epítomo 177DK que justifica 3 (três) de quatro alelos que ficaram descobertos na análise manual. O 177DK foi selecionado por ser o mais frequente dentre os epítomos compartilhados por esses alelos e por possuir *status* no EpRegistry. O mesmo aconteceu para o epítomo 166ES, selecionado pelo EpAssistant para justificar o alelo B*82:01 (Figura 13A).

Por meio da caixa “Alerts” (Figura 13), pode-se visualizar os problemas identificados no resultado da análise manual para os quais a ferramenta não encontrou uma solução adequada. No caso dos alelos que, para o *cut off* de 1500 estabelecido pelo especialista, não mostraram os epítomos causadores de tal reatividade, isto pode indicar que este *cut off* talvez não esteja adequadamente definido, então o EpAssistant sugere que o especialista tente baixar o *cut off* para verificar se aparecerão epítomos que justifiquem essa reatividade e que estejam encobertos pelo valor do *cut off* atual. Esse alerta (“*These alleles have no explaining epitopes. Try a lower cut off value.*” B*27:08, B*55:01, B*42:01, B*56:01, B*67:01) é o primeiro a ser mostrado no espaço “Alerts” da interface e representa uma das principais heurísticas extraídas do conhecimento do especialista em análise epitópica, o fato de que não se devem deixar alelos acima do *cut off* sem epítomos que os justifiquem. Mesmo não estando o *cut off* adequado para concluir a análise, o comportamento esperado da ferramenta é procurar justificar todo o painel segundo essas e outras premissas implementadas em seu código.

Um segundo alerta importante chama a atenção do especialista para epítomos que possuem frequência no painel, pertencem a linhas que ficaram sem justificativa, como alelo B*27:08, mas não possuem *status no EpRegistry*, e, por isso não foram selecionados automaticamente, devendo o usuário averiguar sua relevância e definir o que fazer. Por fim, há o alerta para o alelo B*15:12, que constantemente aparece nos PSAs com MFI elevados, possuindo apenas um epítomo privado, o 163LG que, segundo conhecimento do especialista, representa um falso positivo, sendo assim retirado do resultado da análise automática.

Figura 13: Resultado do Epassistant para o *cut off* de 1500 no painel da Figura 12.



Fonte: A autora (2016).

Desta forma, além de oferecer um resultado automático para a análise epitópica, o EpAssistant também alerta o usuário sobre possíveis situações onde algo importante possa não ter sido percebido inicialmente e, então, sugere o que poderia ser feito para resolver tais inconsistências.

Seguindo o alerta que sugere que o *cut off* seja rebaixado para que possíveis epítomos reativos possam ser revelados, alterou-se o *cut off* inicial de 1500 para 1000 e o resultado aparece na Figura 14. Para o novo *cut off* de 1000, observa-se uma mudança importante em relação ao PSA apresentado na Figura 12– não restaram alelos sem justificar e, para todos os alelos reativos, há epítomos selecionados como responsáveis.

O especialista selecionou os epítomos 180E, 65QIA+76ESN, 41T e 80TLR como resultado da sua análise manual Figura 14. Da mesma forma, o Epassistant corrobora o resultado do especialista elegendo os mesmos epítomos, apenas com o acréscimo do epítomo 156DA, que, caso o analista manual não o considere necessário, poderá descartá-lo. Em alertas apenas o alelo B*15:12 que, como já foi explicado, é retirado da análise por ser considerado um falso positivo do ponto de vista do especialista (Figura 15).

Figura 14: Simulação análise manual com *cut off* 1000.

✓ Controle negativo: 61

✓ Controle positivo: 7593

✓ Analisado

✓ Revisado

Data do teste: · Migrado em: · Alteração: · Responsável:

Cutoff
↻ Analisar
Analyse with EpAssistant Beta

Próprios
Todos
Inaceitáveis
Reativos

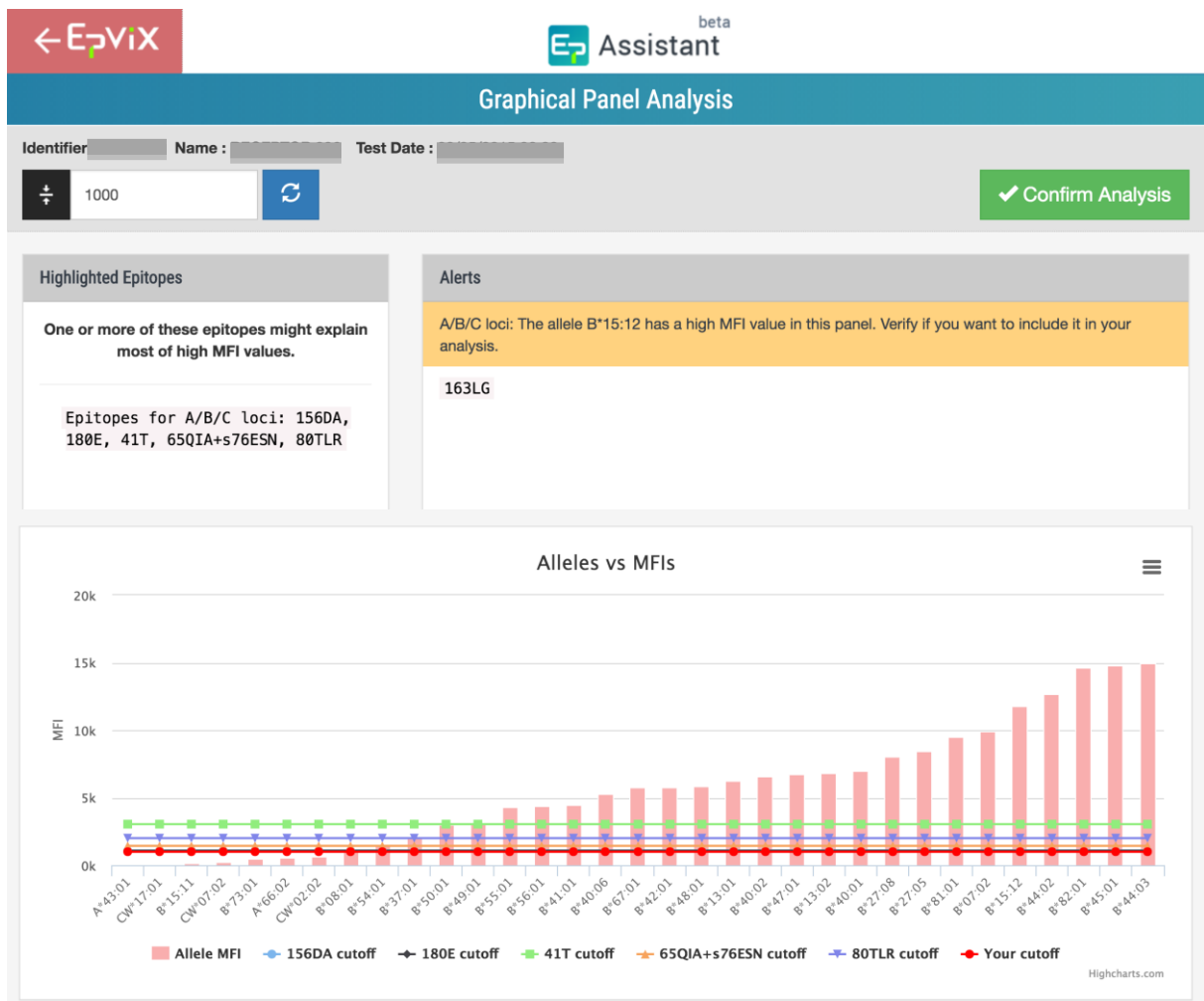
ALELO	MFI	EPLETS
B*44:03	14961	32L 41T 45KE 80TA 80TLR 162GLS 166ES 199V
B*45:01	14834	32L 41T 45KE 156DA 162GLS 166ES
B*82:01	14615	65QIA+s76ESN 70IAQ 156DA 162DLS 166ES
B*44:02	12720	32L 41T 45KE 80TA 80TLR 156DA 162GLS 166ES 199V
B*15:12	11772	163LG
B*07:02	9927	65QIA+s76ESN 70IAQ 97S 163EW+73TE 177DK 180E
B*81:01	9488	65QIA+s76ESN 70IAQ 97S 143S+s76ESN 163EW+73TE 177DK 180E 245TA
B*27:05	8472	32L 71ATD 76ED 80TLR 97N 163EW+73TE
B*27:08	8050	32L 65QIA+s76ESN 97N 163EW+73TE
B*40:01	6967	32L 41T 45KE 143S+s76ESN 163EW+73TE 177DK 180E
B*13:02	6815	41T 80TA 80TLR 144QL 163EW+73TE
B*47:01	6764	32L 41T 45KE 71TTD 76ED 80TLR 163EW+73TE
B*40:02	6554	32L 41T 45KE 97S 163EW+73TE 177DK
B*13:01	6278	41T 80TA 80TLR 144QL 163EW+73TE
B*48:01	5828	97S 143S+s76ESN 163EW+73TE 177DK 180E 245TA
B*42:01	5801	65QIA+s76ESN 70IAQ 97S 156DA 177DT 180E
B*67:01	5749	65QIA+s76ESN 70IAQ
B*40:06	5256	32L 41T 45KE 163EW+73TE 177DK
B*41:01	4509	32L 41T 45KE 156DA 177DT 180E
B*56:01	4428	65QIA+s76ESN 70IAQ
B*55:01	4339	65QIA+s76ESN 70IAQ
B*49:01	3131	32L 41T 45KE
B*50:01	3041	32L 41T 45KE
B*37:01	2000	71TTD 76ED 80TLR 156DA
B*54:01	1437	65QIA+s76ESN 70IAQ
B*08:01	1079	97S 156DA 177DT 180E

👤 Próprio do receptor · Positivo (acima do cutoff) · Positivo (acima do cutoff) · Negativo (abaixo do cutoff)
Baixar como Excel

Confirmar ✓

Fonte: A autora (2016).

Figura 15: Resultado do Epassistant para a análise epitópica com *cut off* 1000.



Fonte: A autora (2016).

Os resultados preliminares da validação estatística do EpAssistant para uma amostra de 179 casos previamente analisados e revisados pelo especialista demonstraram que a ferramenta apresenta uma taxa de concordância total entre os resultados da análise manual e os resultados da análise automática da ordem de 76,8%. Os 23,2% remanescentes correspondem a concordâncias parciais de tipos variados que não serão discutidas nesta tese (Tabela 1). Os dados estatísticos informados antecipadamente aqui têm o intuito de ressaltar que em quase 80% dos casos analisados, o EpAssistant mostrou-se eficaz em realizar análises epitópicas automáticas semelhantes ao especialista humano. E em casos mais laboriosos, geralmente painéis de pacientes hipersensibilizados, que fazem parte do percentual de

concordâncias parciais, foram desenvolvidas estratégias que são apresentadas na forma de alertas na interface com o usuário para auxiliá-lo a tomar a melhor decisão possível para um dado PSA.

Tabela 1: Tabela validação ferramenta Epassistant

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	concordancia completa	129	72,1	76,8	76,8
	concordância parcial	39	21,8	23,2	100,0
	Total	168	93,9	100,0	
Missing	System	11	6,1		
Total		179	100,0		

Fonte: A autora (2016).

Ademais, faz-se pertinente ressaltar que a subjetividade inerente ao problema adicionada à falta de um protocolo padrão para realizar a análise da reatividade epitópica tornaram a confecção desse SE um grande desafio, pois não havendo um padrão identificado, não haveria como formar uma base de conhecimento e, por conseguinte, não se poderia aplicar IA. Essa grande dificuldade que inicialmente fez esta pesquisadora pensar em mudança de projeto, impulsionou-a a buscar alternativas viáveis para automatizar essa tarefa, pois nesta fase já se tinha encerrado o protocolo de estudos e já se tinha também apropriado do conhecimento necessário para iniciar o desenvolvimento. Decidiu-se assim utilizar os conhecimentos adquiridos na construção de um algoritmo convencional, baseado nas heurísticas que o analista humano mostrou ser eficazes na execução de suas tarefas. Sabe-se que o método empregado denota pouco aprendizado por experiência e portanto levanta severas dúvidas sobre a inteligência desse SE, dado que, uma vez encerrado o seu desenvolvimento, o seu desempenho não irá melhorar sem a ajuda do desenvolvedor. Entretanto, o fato de não ser capaz de “aprender”, não o desqualifica como um SE, pois em sua essência emprega o conhecimento oriundo de especialistas humanos diretamente em seu algoritmo, podendo fazer uso de toda a capacidade de processamento de um computador.

5 CONCLUSÃO

Muitos esforços foram despendidos no estudo e acompanhamento do processo de análise da reatividade epitópica, nas atividades envolvidas em compreender o problema e no estudo de técnicas avançadas de criação de *software* utilizando abordagens de inteligência computacional. Os passos do protocolo de estudo do problema foram fundamentais para determinar os rumos deste campo de pesquisa e semear possibilidades promissoras para trabalhos futuros.

O processo de análise da reatividade epitópica automatizado em um ponto de corte específico reduzirá o tempo para a produção dos resultados finais, possibilitando a análise de um volume muito maior de painéis simultaneamente. Somente este fato já melhora sobremaneira o trabalho do especialista, pois aumenta sua produtividade e desempenho. O uso do EpAssistant poderá reduzir ainda o grau de dependência que os laboratórios de histocompatibilidade têm de profissionais especializados, contribuindo para universalização do uso da análise da reatividade epitópica para todos os tipos de usuários, independente da *expertise*, além da possibilidade de seu uso como ferramenta de treinamento para novos usuários.

É importante ressaltar que o EpAssistant não substitui o especialista humano. Há situações complexas e extraordinárias em que o especialista valer-se-á do conhecimento teórico mais fundamental ou em que poderá recordar-se de situações parecidas ocorridas no passado que serão úteis à solução. A grande vantagem do EpAssistant é a capacidade de seguir linhas de raciocínio típicas, de forma sistemática e assim garantir que hipóteses razoáveis não tenham sido ignoradas. Por simplificar o processo de análise epitópica

Sobretudo, esse trabalho servirá como um arcabouço concreto a ser utilizado na construção de outros sistemas derivados do EpAssistant usando estratégias inteligentes.

6 TRABALHOS FUTUROS

O referencial teórico estudado indica que projetos futuros podem melhorar a ferramenta utilizando a lógica nebulosa para criar um SE mais robusto e com maior precisão para inferir um resultado final. A modelagem do problema da análise da reatividade epitópica utilizando lógica fuzzy, apesar de complexo e de difícil modelagem, pode gerar resultados significativos que indiquem o ponto de corte ideal para a análise epitópica.

Por fim, uma validação científica estatística está sendo finalizada e atestará o quão eficiente a ferramenta é para o problema que se propôs a resolver, ou seja, saber-se-á o grau de acurácia obtido pelo EpAssistant na identificação da especificidade epitópica do anticorpo anti-hla pré-formado em soro de candidatos a transplante de órgãos e tecidos.

7 ANEXOS

Artigo: “**Web-based ecosystem software for virtual crossmatching in transplant programs**” aceito para publicação na Revista **Computers In Biology in Medicine**, da Elsevier, Qualis B1 na Ciências da Computação.

Web-based ecosystem software for virtual crossmatching in transplant programs

Keylla S.U. Aita, MD¹; Semiramis, J.H. Monte, PhD^{2,5}; Adalberto S. Silva, PhD^{2,4}; Mário S. C. Marroquim²; Antônio Gilberto B. Coelho²; Luiz Claudio D. M. Sousa, PhD^{2,3}

¹Distance Education Centre, Federal University of Piauí, Rua Olavo Bilac - Bairro Centro, CEP:64280001, keyllaurtiga@ufpi.edu.br; (+55 86) 32154101, Teresina, Piauí, Brazil

² Immunogenetics and Molecular Biology Laboratory, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

³Computation Department, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁴Department of Biology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁵Health Sciences Centre, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

ABSTRACT

Background The compatibilities between donors and recipients are extremely important for evaluating the immunological risks of transplants. One challenge faced by data analysis tools is the transformation of complex data into simple, intuitive, and important information that can be used to resolve contemporary problems. To address this challenge, we developed the EpViX software to perform epitope reactivity analyses and automated epitope virtual crossmatching. EpViX is a facilitator of medical decision-making regarding the identification of the best donor for a high-immunologic risk recipient. The objective of this work is to describe the computational architecture of the EpViX ecosystem (<http://www.epvix.com.br>).

Materials and Methods EpViX is a freeware on the web that was developed in the Ruby language. EpViX can be accessed from different platforms, e.g., PCs, tablets, and smartphones. It consists of an ecosystem of tools that are capable of integrating all of the stakeholders who are involved in a transplant process with a deceased donor.

Results We successfully developed a program that allows people to work collaboratively and effectively during the donation process by accurately predicting negative crossmatches, saving time and other resources.

Conclusions EpViX represents a significant breakthrough for the organ transplant process and may meet the current needs of transplant programs because it increases the chances of the allocation of low-immunologic risk donors to highly sensitized recipients and assures greater equity among the recipients on a waiting list. EpViX was duly verified and tested in terms of data security. Moreover, usability tests demonstrated that EpViX is an intuitive and easy-to-use tool.

KEYWORDS

HLA Epitopes, Virtual Crossmatch, Web-based software, Epitope reactivity analyses, Decision-making

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Pedro José Negreiros De. **Sistemas Especialistas de Apoio ao Diagnóstico em Medicina. Relações com o Teorema de Bayes e com a Lógica do Raciocínio Diagnóstico.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 73, p. 537–544, 1999.

ANUNCIACÃO, Fernando Antonio Costa *et al.* **EpViX: A cloud-based tool for epitope reactivity analysis and epitope virtual crossmatching to identify low immunologic risk donors for sensitized recipients.** *Transplant Immunology*, v. 33, n. 3, p. 153–158, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096632741530023X>>.

BARNETT, G O *et al.* **DXplain. An evolving diagnostic decision-support system.** *JAMA*, v. 258, n. 1, p. 67–74, 3 jul. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3295316>>. Acesso em: 21 maio 2016.

BUCHANAN, B.; SHORTLIFFE, E. **The Context of MYCIN Experiments.** v. 27, p. 24–27, 1962.

CHEN, Yen-Lin *et al.* **An intelligent knowledge-based and customizable home care system framework with ubiquitous patient monitoring and alerting techniques.** [S.l: s.n.], 2012. v. 12. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865382938&partnerID=tZOtx3y1>>.

CLAAS, Frans H J *et al.* **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*, v. 78, n. 2, p. 190–3, 27 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280676>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

COSTA, Welbson Siqueira; SILVA, Shirlylly Christiany Macedo. **Aquisição de Conhecimento: O Grande Desafio na Concepção de Sistemas Especialistas.** *Holos*, p. 37–46, 2005.

DHAR, Pawan K; ZHU, Hao; MISHRA, Santosh K. **Computational approach to systems biology: from fraction to integration and beyond.** *IEEE transactions on nanobioscience*, v. 3, n. 3, p. 144–52, set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473066>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015). 2015. Disponível em: <www.abto.org.br>. Acesso em: 12 jul. 2016.

DOXIADIS, Ilias I N; DUQUESNOY, Rene J; CLAAS, Frans H J. **Extending options for highly sensitized patients to receive a suitable kidney graft.** *Current opinion in immunology*, v. 17, n. 5, p. 536–40, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084709>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

DUDA, R O; SHORTLIFFE, E H. **Expert Systems Research.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 220, n. 4594, p. 261–8, 15 abr. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6340198>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

DUQUESNOY RJ, MULDER A, ASKAR M, FERNANDEZ-VINA M, Claas FH. **A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune**

level. *Hum Immunol*, v. 66, p. 749–61, 2005.

DUQUESNOY, R. J. *et al.* **16th IHIW: A Website for Antibody-Defined HLA Epitope Registry.** 2013, [S.l: s.n.], 2013. p. 54–59.

DUQUESNOY, R. J. **Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation.** *Current opinion in immunology*, v. 20, n. 5, p. 594–601, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655832>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

DUQUESNOY, R. J. **Epitope-based human leukocyte antigen matching for transplantation.** *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 19, n. 4, p. 418–419, 2014a. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00075200-201408000-00014>>.

DUQUESNOY, R. J. *et al.* **First report on the antibody verification of HLA-ABC epitopes recorded in the website-based HLA Epitope Registry.** *Tissue Antigens*, v. 83, n. 6, p. 391–400, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2014.09.012>>.

DUQUESNOY, R. J. *et al.* **HLAmatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival.** *Transplantation*, v. 75, n. 6, p. 884–889, 2003.

DUQUESNOY, R. J. **HLAMATCHMAKER: a molecularly based donor selection algorithm for highly alloimmunized patients.** *Transplantation Proceedings*, v. 33, n. 1-2, p. 493–497, 2001.

DUQUESNOY, R. J. **Human leukocyte antigen epitope antigenicity and immunogenicity.** *Current opinion in organ transplantation*, v. 19, n. 4, p. 428–435, 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25010064>>.

DUQUESNOY, R. J. *et al.* **Should HLA Mismatch Acceptability for Sensitized Transplant Candidates Be Determined at the High-Resolution Rather Than the Antigen Level?** *American Journal of Transplantation*, p. n/a–n/a, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778447>>.

DUQUESNOY, R. J.; MARRARI, M. **Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens.** *Tissue Antigens*, v. 74, n. 2, p. 117–133, 2009.

DUQUESNOY, R. J.; MARRARI, Marilyn. **HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. II. Verification of the algorithm and determination of the relative immunogenicity of amino acid triplet-defined epitopes.** *Human immunology*, v. 63, n. 5, p. 353–63, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975979>>.

EFRAIM TURBAN, Louis E. Frenzel. **Expert Systems and Applied Artificial Intelligence.** Michigan: Macmillan Publishing Company, 1992.

ELLIS, T.M. **Interpretation of HLA single antigen bead assays.** *Transplant Rev*, v. 27, p. 108–111, 2013.

JERZY W. GRZYMALA-BUSSE. **Managing Uncertainty in Expert Systems.** Kansas: SpringerScience+Business Media New York, 1991.

JSON. Disponível em: <<http://www.json.org/>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

LIAO, Shu Hsien. **Expert system methodologies and applications-a decade review from 1995 to 2004**. *Expert Systems with Applications*, v. 28, n. 1, p. 93–103, 2005.

LUGER, George F. **Artificial intelligence**. 6. ed. [S.l.]: Pearson Education, Inc., 2013.

MILLER, R A *et al.* **The INTERNIST-1/QUICK MEDICAL REFERENCE project--status report**. *The Western journal of medicine*, v. 145, n. 6, p. 816–22, dez. 1986.

Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1307155&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 maio 2016.

MILLER, R A; POPLE, H E; MYERS, J D. **Internist-1, an experimental computer-based diagnostic consultant for general internal medicine**. *The New England journal of medicine*, v. 307, n. 8, p. 468–76, 19 ago. 1982. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7048091>>. Acesso em: 21 maio 2016.

NEGNEVITSKY, Michael. **Artificial intelligence : a guide to intelligent systems**. [S.l.]: Addison Wesley, 2002.

PAPERT, Seymour. **Mindstorms**. New York: Basic Books, 1980.

PATEL, R; TERASAKI, P I. **Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation**. *The New England journal of medicine*, v. 280, n. 14, p. 735–9, 3 abr. 1969.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4886455>>. Acesso em: 15 set. 2015.

PEREIRA, Walter. **Diretrizes básicas para captação e retirada de múltiplos órgãos e tecidos - Associação Brasileira De Transplante De Órgãos**. 2009. Disponível em:

<<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/pdf/livro.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

PYTHON DOCUMENTATION. Disponível em:

<<https://wiki.python.org/moin/BeginnersGuide/Overview>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

PYTHON LANGUAGE. Disponível em: <<http://www.python.org>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

REZENDE, Solange. **Sistemas Inteligentes: fundamentos e aplicações**. Barueri, SP: Manole, 2005.

RIBEIRO JUNIOR, Divino Ignácio. **Modelo de Sistema Baseado em Conhecimento para Apoiar Processos de Tomada de Decisão Em Ciência e Tecnologia**. 2010. 204 f. 2010.

RUSSELL, Stuart J. (Stuart Jonathan); NORVIG, Peter.; DAVIS, Ernest. **Artificial intelligence : a modern approach**. [S.l.]: Prentice Hall, 2010.

SALES FILHO, Herton Luiz Alves Sales *et al.* **EpHLA software: A timesaving and accurate tool for improving identification of acceptable mismatches for clinical purposes**. *Transplant Immunology*, v. 26, n. 4, p. 230–234, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966327412000238>>.

SANCHEZ, Eider *et al.* **A Knowledge-based Clinical Decision Support System for the diagnosis of Alzheimer Disease**. *2011 IEEE 13th International Conference on e-Health Networking, Applications and Services*, p. 351–357, 2011.

SELLMER, D. *et al.* **Sistema Especialista para apoiar a decisão na terapia tópica de úlceras venosas**. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 34, n. 2, p. 154–162, 2013.

SETO, Emily *et al.* **Developing healthcare rule-based expert systems: Case study of a heart failure telemonitoring system**. *International Journal of Medical Informatics*, v. 81, n.

8, p. 556–565, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmedinf.2012.03.001>>.

SHORTLIFFE, Edward H. **Medical Informatics Medical Expert Systems-Knowledge Tools for Physicians.** *West J Med*, p. 830–839, 1986.

SOUSA, Luiz Cláudio Demes Da Mata *et al.* **EpHLA: An innovative and user-friendly software automating the HLA Matchmaker algorithm for antibody analysis.** *Transplant Immunology*, v. 25, n. 4, p. 210–216, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2011.08.008>>.

TAMBUR, A R; CLAAS, F H J. **HLA epitopes as viewed by antibodies: what is it all about?** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, v. 15, n. 5, p. 1148–54, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25708017>>. Acesso em: 4 maio 2016.

TERASAKI, Paul I. **Humoral theory of transplantation.** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, v. 3, n. 6, p. 665–73, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780557>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

TRIVEDI, V B *et al.* **Human leukocyte antigen and its role in transplantation biology.** *Transplantation proceedings*, v. 39, n. 3, p. 688–93, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445574>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

TURBAN, Efraim.; ARONSON, Jay E.; LIANG, Ting-Peng. **Decision support systems and intelligent systems.** [S.l.]: Pearson/Prentice Hall, 2005.

VAN SOMEREN, M.W., BARNARD AND Y.F., SANDBERG, J.A.C. **The think aloud method: A practical guide to modelling cognitive processes.** New York: Academic Press Ltd., 1994.

WARNER, H R. **Iliad: moving medical decision-making into new frontiers.** *Methods of information in medicine*, v. 28, n. 4, p. 370–2, nov. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2695788>>. Acesso em: 21 maio 2016.

WEB2PY. Disponível em: <<http://www.web2py.com/>>. Acesso em: 8 jan. 2015.

ZWICKER, Ronaldo; REINHARD, Nicolau. **Acquisition of routine cognitive skills by computer users: a study of intelligent computer aided instruction.** 1990, New York, New York, USA: ACM Press, 1990. p. 355–366. Disponível em: <<http://portal.acm.org/citation.cfm?doid=97709.97734>>. Acesso em: 15 jul. 2016.