UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

COMPARAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE *SHORT TANDEM REPEATS* E DO GENE DA AMELOGENINA NA AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO NOS DOENTES PÓS TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Irina Daniela Costa Clemente

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Professora Doutora Isabel Leal Barbosa (Instituto Português de Oncologia do Porto)

Vila Real, 2013

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

COMPARAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE *SHORT TANDEM REPEATS* E DO GENE DA AMELOGENINA NA AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO NOS DOENTES PÓS TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Irina Daniela Costa Clemente

Orientadores:

Professora Doutora Isabel Leal Barbosa

Professora Doutora Maria Manuel Oliveira

Vila Real, 2013

Orientador: _____

Professora Doutora Isabel Leal Barbosa
(Centro de Investigação, IPO do Porto)

Co-Orientador: _____

Professora Doutora Maria Manuel Oliveira
(Departamento de Química, UTAD)

Dissertação para atribuição do Grau de Mestre em Bioquímica

"As doutrinas expostas no presente trabalho, são da exclusiva responsabilidade do autor."

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível com a colaboração de diversas pessoas e entidades, às quais quero expressar o meu profundo reconhecimento e gratidão:

À Professora Doutora Isabel Leal Barbosa, pela oportunidade, orientação e acompanhamento em todas as etapas deste trabalho, por todo o apoio concedido a nível científico e pedagógico.

À Professora Doutora Maria Manuel Oliveira, pela co-orientação, pela disponibilidade demonstrada, pelos conselhos científicos e por todo o apoio ao longo destes dois anos de Mestrado.

Ao Doutor Carlos Mendes, Director do Serviço de Hematologia Laboratorial no IPO-Porto, pelas facilidades concedidas na elaboração deste trabalho.

Às técnicas do Serviço de Hematologia, pela forma como me receberam, pelo carinho e apoio constante.

Às técnicas do Serviço de Virologia e Microbiologia, assim como todos os estagiários, pela amizade, pelo agradável convívio e constante camaradagem.

À Mestre Joana Ribeiro, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e palavras confortantes nos momentos mais difíceis e, principalmente pela sincera amizade.

Às amigas e colegas de faculdade, Sara e Helena, pelos desabafos e palavras de incentivo e motivação. Provamos que a distância não demove amizades, intensifica-as.

Aos amigos, que compreenderam a minha ausência durante esta fase, pelo alento e paciência com que me ouviram muitas vezes.

À minha família, em especial os meus padrinhos, por todo o apoio e por tudo aquilo que tem sido.

Aos meus pais, por investirem no meu futuro, por acreditarem sempre em mim, pelo amor e carinho que nunca me faltou. Obrigado por me ensinarem a importância dos valores morais, que me transformaram no que sou hoje.

Ao Pedro, não tenho palavras para agradecer, obrigada pela paciência e dedicação incondicional, foste o meu suporte.

RESUMO

A análise de quimerismo, nos doentes pós transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos, tornou-se um procedimento de rotina para avaliar o sucesso do transplante e na deteção de falência do enxerto. Após alotransplante o doente apresenta quimerismo completo, quando apenas têm células do dador ou quimerismo misto, quando têm células próprias e do dador. Para a análise de quimerismo, as células do dador e do doente são distinguidas por marcadores genéticos designados como *short tandem repeats* informativos, que são utilizados para efetuar o seguimento dos doentes no período pós transplante.

Este trabalho teve como objetivos monitorizar o estado de quimerismo em doentes pós alotransplante, e comparar duas técnicas moleculares para avaliação do estado de quimerismo: amplificação de *short tandem repeats*, e amplificação do gene da amelogenina em pares dador/doente de sexos diferentes, pela técnica de reacção em cadeia da polimerase seguida de electroforese capilar. Os *short tandem repeats* utilizados foram: D11s, F131, THO, VWA, FES, FGA, HPRT. A análise foi realizada através de ADN extraído do sangue, nas subpopulações de leucócitos - células mononucleares e granulócitos.

No presente estudo, foi analisado o quimerismo de 24 doentes alotransplantados, o seguimento médio destes doentes foi de 6 meses. O quimerismo foi analisado pela amplificação de *short tandem repeats* (n=24) e do gene da amelogenina (n=14). Os resultados obtidos para a análise de quimerismo foram: 20 doentes apresentaram sempre quimerismo completo e 4 doentes quimerismo misto. Dos doentes com quimerismo misto, 2 evoluíram para quimerismo completo e 2 mantiveram o mesmo estado.

Foi possível concluir que, para a avaliação do quimerismo dos doentes, ambas as técnicas, *short tandem repeats* e gene da amelogenina, são informativas e podem ser realizadas separadamente ou de uma forma complementar.

Palavras-chave: Transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos, quimerismo, *short tandem repeats*, amelogenina.

ABSTRACT

Chimerism analysis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has become a routine procedure, for monitoring the engraftment of donor cells, thus allowing early detection of graft failure. After allogeneic stem cell transplantation the patient has complete chimerism when only has donor cells, or mixed chimerism when he has his own and the donor's cells. To the chimerism analysis, donor cells and patient's cells are distinguished by genetic markers, named informative STR. They are used to perform the following of patients in the post-transplant period.

The aim of this study were to monitor chimerism status in patients following allogeneic stem cell transplantation, and to compare two molecular techniques to assess the state of chimerism: amplification of short tandem repeats and amplification of amelogenin gene in pairs donor/patient of different gender by polymerase chain reaction technique. The analysis was performed using DNA extracted from blood leukocyte subpopulations - mononuclear cells and granulocytes. The short tandem repeats used were: D11s, F131, THO, VWA, FES, FGA, HPRT and the amelogenin gene, were amplified by the polymerase chain reaction, followed by capillary electrophoresis analysis.

In this study, we performed follow up evaluation of 24 patients submitted to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The median follow up of these patients was 6 months. The chimerism was analyzed by amplification of short tandem repeats (n=24) and amelogenin gene (n=14). Majority of patients (n=20) consistently showed complete chimerism and 4 patients showed mixed chimerism. From the patients with mixed chimerism, 2 progressed to complete chimerism and 2 remained in the same condition.

In summary, both techniques, short tandem repeats and amelogenin gene, are informative and can be performed individually or in a complementary way to evaluate the chimerism status of allotransplanted patients.

Keywords: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, chimerism, short tandem repeats, amelogenin.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS VI
RESUMO VII
ABSTRACT VIII
ÍNDICE IX
ÍNDICE DE FIGURAS XI
ÍNDICE DE QUADROS XIII
ABREVIATURAS E SIGLAS XIV

INTRODUÇÃO 1

1.TRANSPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS 2
1.1 Células Progenitoras Hematopoiéticas 2
1.2 Transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas 3
2. QUIMERISMO 4
2.1 Técnicas de análise de quimerismo 5
2.1.1 Marcadores genéticos utilizados em quimerismo 7
2.1.2 Técnicas de PCR e Análise de fragmentos por Electroforese capilar 10

OBJETIVOS 12

1. ESTADO DE ARTE E OBJETIVOS DO TRABALHO 13

MATERIAL E MÉTODOS 14

1.POPULAÇÃO EM ESTUDO 15
2. MÉTODOS 15
2.1 Isolamento de populações de leucócitos: células mononucleares e granulócitos 15
2.2 Extração e quantificação de ADN 15
2.3 Análise de quimerismo por amplificação de marcadores genéticos, STRs e Gene da Amelogenina 18
2.3.1 Técnica de PCR 18
2.3.2 Electroforese em gel de Agarose 20
2.3.3 Análise de fragmentos por Electroforese Capilar 20

RESULTADOS **21**

1. GRUPO DE DOENTES TRANSPLANTADOS 22
2. STR – PCR E ANÁLISE DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESE CAPILAR 24

2.1 str informativo *25*

2.2 Frequência dos STRs informativos *28*

3. AVALIAÇÃO DE QUIMERISMO 29

..... 29

3.1 Tempo médio dos seguimentos dos doentes pós Alo-TPH *29*

3.2 Avaliação do quimerismo nos doentes submetidos a Alo-TPH *29*

3.2.1 Seguimento dos doentes com Quimerismo Completo *31*

3.2.2 Seguimento dos doentes com Quimerismo Misto *33*

4. AMELOGENINA COMO INDICADOR DE QUIMERISMO ENTRE INDIVÍDUOS DE SEXOS DIFERENTES 35

4.1 Comparação entre Amelogenina e STRS para identificação de quimerismo ... *35*

DISCUSSÃO E CONCLUSÂO **39**

1. AVALIAÇÃO DE QUIMERISMO DOS DOENTES NO PERÍODO PÓS TRANSPLANTE 40

PERSPETIVAS FUTURAS **44**

1.TRANSPLANTAÇÃO HEMATOPOIÉTICA NO SÉCULO XXI 45

2.NOVAS PERSPETIVAS DE TRABALHO NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA 45

BIBLIOGRAFIA **47**

ANEXOS **56**

PROTOCOLOS LABORATORIAIS 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análise de QM e QC num doente pós Alo-TPH (Adaptado de Champlin, *et al* 2001) 5

Figura 2. Análise de quimerismo pós TPH (Adaptado de Lamba *et al*, 2004) 8

Figura 3. Localização cromossómica do gene da Amelogenina (Adaptado de Sasaki *et al*, 1995) 9

Figura 4. Ciclo de reacção de PCR (Solomons *et al*, 2011) 10

Figura 5. Análise de fragmentos por electroforese capilar. Os produtos de PCR diferenciam-se por tamanho em pb (Adaptado de Hill *el al*, 2007) 11

Figura 6. Gel de agarose a 1,5%; (A) Análise dos produtos de PCR com o STR informativo D11s; (B) Controlo negativo; (C) Marcador Molecular de 50 pb 24

Figura 7. STRs informativos por par dador/doente 25

Figura 8. STRs informativos num par dador/doente; (A) Dador; (B) Doente 26

Figura 9. Exemplo de um par dador/doente com 4 STRs informativos; (A) Dador; (B) Doente 27

Figura 10. Pares dador/doente com um STR informativo 28

Figura 11. Frequência de cada um dos STRs como identificador de pares dador/doente . 28

Figura 12. Quimerismo dos doentes, no 1º mês, pós transplante 29

Figura 13. Quimerismo dos doentes, no 3º mês, pós transplante 30

Figura 14. Quimerismo dos doentes, no 6º mês, pós transplante 30

Figura 15. Seguimento dos doentes com Quimerismo Completo 31

Figura 16. Exemplo de um doente com QC nas CMN e nos GRAN 32

Figura 17. Seguimentos dos doentes com Quimerismo Misto 33

Figura 18. Exemplo de um doente com QM que evolui para QC (a seta indica o QM com a presença de células do doente ao 3ºmês pós transplante) 34

Figura 19. Análise de fragmentos do gene da amelogenina, em que o dador é do sexo feminino e o doente do sexo masculino..... 35

Figura 20. Seguimento dos doentes que realizaram análise de quimerismo por STRs e Amelogenina e apresentaram sempre QC 36

Figura 21. Análise de fragmentos do gene da amelogenina e do STR F131 do doente 9 para identificação de quimerismo (as setas indicam o QM ao 3º mês pós transplante) 37

Figura 22. Análise de fragmentos do gene da amelogenina e do STR D11s para a identificação de quimerismo. O doente apresentou QC nas CMN e nos GRAN, ao 3ºmês pós transplante 38

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Comparação das diferentes técnicas para a análise de quimerismo 6

Quadro 2. STRs organizados em repetições de 2 a 6 nucleotídos.....8

Quadro 3. Descrição dos STRs utilizados; localização cromossómica e sequência dos *primers*.....19

Quadro 4. Características dos doentes e dos seus transplantes 22

Quadro 5. Quantificação de ADN nas frações de CMN e GRAN 23

Quadro 6. Tamanho dos fragmentos em pares de base 25

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Alo-TPH	Transplante Alogénico de progenitores hematopoiéticos
pb	Pares de bases
CMN	Células Mononucleares
CPH	Células Progenitoras Hematopoiéticas
dNTPs	Desoxinucleotídeos tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FISH	Hibridização *in situ* por fluorescência
GRAN	Granulóctios
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QC	Quimerismo Completo
QM	Quimerismo Misto
SNPs	*Single Nucleotide Polimorphisms*
STRs	*Short tandem repeat*
TBE	Tris/Ácido Bórico/EDTA
TPH	Transplante Progenitores Hematopoiéticos
VNTRs	*Variable Number Tandem Repeats*

INTRODUÇÃO

1.TRANSPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

Numa perspetiva histórica, em 1959, foi realizado o primeiro transplante de medula óssea num doente por um grupo de Seattle, liderado pelo Professor *Edward Donnall Thomas* (1). O doente com leucemia aguda foi tratado com irradiação corporal total seguida da infusão de células da medula óssea da sua irmã gémea. Porém, a prática clinica do transplante de medula óssea apenas começou no início dos anos 60, após identificação do antigénio leucocitário humano (HLA), tornando possível a descoberta de dadores compatíveis. Em 1970, o grupo de Seattle, realizou o primeiro transplante de medula óssea com dador não aparentado, em doentes com leucemia, estimulando a formação de bancos de dadores (1-4).

O transplante de medula óssea, atualmente referido como transplante de progenitores hematopoiéticos (TPH), é o tratamento preferencial para várias doenças hematológicas, malignas e não malignas tais como: talassemia, anemia falciforme, imunodeficiência, anemia aplástica grave, síndromes de falência de medula óssea entre outros (5-7). O princípio fundamental do TPH consiste na destruição das células malignas do doente total ou parcialmente com quimioterapia e/ou radioterapia de alta dose para posteriormente se restabelecer a função da medula óssea (8, 9). Esta recuperação da actividade hematopoiética é alcançada mediante a infusão de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) provenientes do próprio doente, no caso do autotransplante ou provenientes de um dador aparentado ou não aparentado, no caso do transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos, também referido como alotransplante hematopoiético (Alo-TPH) (10-12).

1.1 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

As células progenitoras hematopoiéticas têm sido estudadas extensivamente devido à sua capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas (13). As possíveis fontes de CPH para transplante são: a medula óssea, o sangue do cordão umbilical e o sangue periférico após mobilização, sendo este último a fonte mais utilizada atualmente em transplantação. A maioria das CPH encontra-se na medula

óssea, contudo são diversos os agentes que podem induzir a mobilização das CPH da medula óssea para o sangue periférico, sendo designadas por células progenitoras do sangue periférico (3).

As CPH expressam uma glicoproteína, o antígeno CD34, que permite a sua quantificação, sendo designadas por células CD34+. A citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD34, é o método que permite a sua identificação e quantificação (14). O número de células CD34+ no sangue periférico determina o momento em que se inicia o processo de colheita de CPH. O critério estabelecido em vários centros de transplante é a presença de 10 células CD34+/ µL sangue para o início das colheitas (14). O total de células CD34+ colhido do sangue periférico após mobilização é superior ao obtido na colheita de medula óssea, factor importante pois o número de células CD34+ infundidas está relacionado com o tempo de recuperação da hematopoiese do doente. O conteúdo celular também é diferente, dado que o valor de linfócitos T é bastante superior na colheita de CPH do sangue periférico do que nas CPH da medula óssea (15-17).

1.2 TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

O tipo de transplantação adequado a cada doente deve ser individualizado de acordo com a sua patologia e condição física. Em doenças hematopoiéticas, tais como, leucemias agudas, leucemias crónicas, síndrome mielodisplásico e anemia aplástica, o transplante mais indicado é o Alo-TPH (15, 18-20).

Os doentes antes de realizarem Alo-TPH, recebem elevadas doses de quimioterapia e/ou radioterapia, com o objectivo de eliminar as células tumorais. Estas fases de tratamento designam-se como regimes de condicionamento. Atualmente existem dois tipos de condicionamento (mieloablativos *vs* não mieloablativos). Os regimes de condicionamento mieloablativos, devido à sua elevada toxicidade, não são tolerados em doentes com idades avançadas. Os regimes de condicionamento não mieloablativos também designados como condicionamentos de intensidade reduzida, podem eliminar de igual forma as células tumorais, com menor toxicidade, sendo aplicados a doentes com idades avançadas (21).

Contudo este tipo de condicionamento está associado a um maior risco de recaída da doença (22-24). A recuperação da hematopoiese dos doentes, pós Alo-TPH, está dependente do número de células infundidas e da sua fonte, bem como das condições clinicas do doente (18, 25). Durante as primeiras semanas, o doente permanece em aplasia medular (leucócitos, glóbulos vermelhos e plaquetas encontram-se em níveis baixos) e por isso, as primeiras semanas são cruciais na sua recuperação. Para a avaliação da recuperação da hematopoiese é necessária a realização de um hemograma completo: contagem de glóbulos vermelhos, contagem de leucócitos, contagem de neutrófilos e plaquetas. Atualmente considera-se que existe recuperação hematopoiética, no dia correspondente ao 1º de 3 dias consecutivos com contagens superiores a 0,5 $x10^9$/L neutrófilos e ao 1º de 7 dias consecutivos nas quais o doente apresenta, simultaneamente contagens superiores a 20 $x10^9$/L plaquetas (18, 26).

2. QUIMERISMO

Os doentes após Alo-TPH são referidos como quimeras hematopoiéticas, sendo determinante avaliar a contribuição das células do dador para o transplante. O desenvolvimento de quimerismo completo (QC), num doente transplantado significa que 100% das suas células provém do dador. Por sua vez, a presença no doente de células hematopoiéticas próprias e do dador, indica-nos a presença de quimerismo misto (QM) (27). Outras situações possíveis após um Alo-TPH são a rejeição do enxerto ou a recaída do doente (28-30). Nos primeiros estudos sobre quimerismo, acreditava-se que era necessário um QC para o sucesso de um Alo-TPH, mas nas últimas décadas tornou-se evidente que o QM pode estar presente, podendo coexistir células do dador e do doente após transplante sem que haja recaída ou recidiva da doença (31, 32). A presença do QM pode ser interpretada como uma fase de tolerância que indica o sucesso do transplante ou pode indicar a recaída da doença.

O quimerismo misto ou completo podem ser estados permutáveis, tendo sido descritos casos de doentes com QC em que num determinado ponto da sua recuperação desenvolveram quimerismo misto, assim como o contrário (33). Na Figura 1, está exemplificado um doente que evoluiu de QM pós transplante para QC (34).

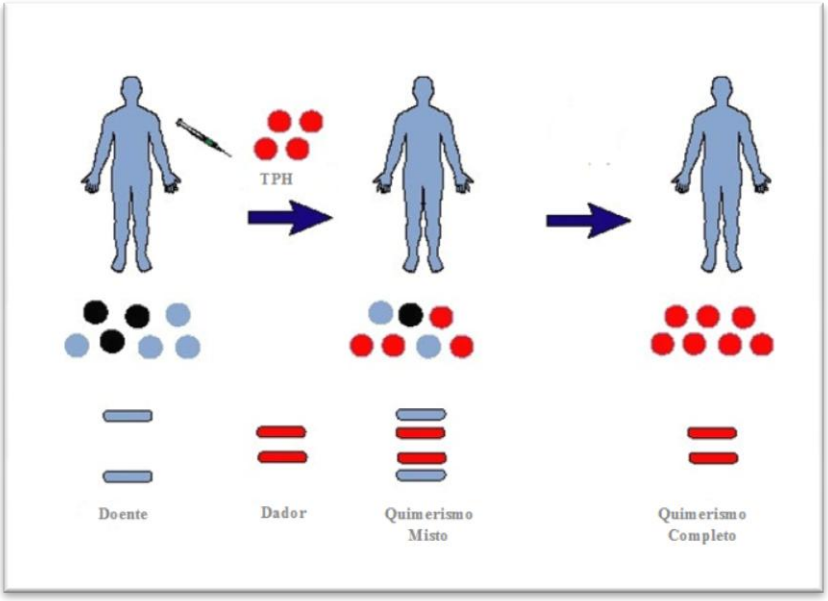


Figura 1. Análise de QM e QC num doente pós Alo-TPH (Adaptado de Champlin, *et al* 2001)

A análise de quimerismo pode ser realizada em sangue total, contudo a maioria dos investigadores propõe a separação celular das diferentes populações do sangue: células mononucleares (CMN) e granulócitos (GRAN) (10, 35, 36). Devido ao aumento da sensibilidade, este tipo de análise pode ser utilizada para revelar quimerismo misto em populações específicas de leucócitos que são mascarados na análise de sangue total. O risco de recorrência da doença pode ser mais elevado em doentes com quimerismo misto em relação aos doentes com quimerismo completo (35, 37, 38).

2.1 TÉCNICAS DE ANÁLISE DE QUIMERISMO

O estado de quimerismo pode ser utilizado como procedimento padrão na avaliação de doentes pós TPH, e para tal são diversas as técnicas que se podem utilizar para a sua análise: hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), identificação de repetições de *short tandem repeats* (STRs), *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNPs) ou *Variable Number Tandem Repeats* (VNTRs) por reacção em cadeia da polimerase (PCR). O Quadro 1 resume as principais características de cada uma das técnicas, vantagens e desvantagens (39-42).

Quadro 1. Comparação das diferentes técnicas para a análise de quimerismo

Técnicas	Nível de deteção %	Vantagens	Desvantagens
FISH	0,1-0,5	Elevada deteção Possibilidade quantificação de células	Restritiva ao sexo Técnica muito dispendiosa
STR-PCR	1-5	Necessita de pequenas quantidades ADN Altamente informativa	Deteção Moderada
VNTR-PCR	0,01-0,1	Excelente discriminação entre indivíduos	Necessita de grandes quantidades ADN
SNP-PCR	0,00 -0,1	Excelentes marcadores em casos de ADN degradado	Pouco informativos
Amelogenina – PCR	0,001	Altamente informativa	Restritiva ao sexo

A técnica de FISH permite a identificação de sequências específicas de ácidos nucleicos, através da utilização de sondas de ADN marcadas com fluorescência. Após a hibridização, são normalmente contabilizadas entre 500 a 1000 células em interfase marcadas com as diferentes sondas para os cromossomas X e Y. A principal desvantagem da técnica de FISH na análise do quimerismo, é a sua aplicação restrita a pares de sexos diferentes (43-45).

A técnica de PCR com amplificação de sequências altamente polimórficas tornou-se, assim, a técnica predominante na análise de quimerismo. Os SNPs são variações num único nucleotído ao nível da sequência de ADN, podendo consistir em inserções, deleções ou substituições nucleotídicas. Os produtos de PCR resultantes da análise de SNPs podem ter um tamanho inferior a 100 pares de bases (pb), o que

significa que são excelentes candidatos a marcadores nas situações em que o material genético está degradado. A maioria dos SNPs apresenta apenas dois alelos, e por isso, são menos informativos do que os STRs, que tipicamente apresentam vários alelos. A quantidade necessária de SNPs para obter o mesmo poder de discriminação fornecida pelos STRs seria de 50-100, sendo necessário uma quantidade de amostra de ADN muito superior (46). Os VNTRs ou minissatélites são sequências curtas de bases, exibem uma enorme variabilidade e são constituídos por 9 a 100 pb repetidos sequencialmente. Dado que os STRs são mais polimórficos e possuem menor tamanho são actualmente os marcadores mais utilizados para avaliação de quimerimo, tal como descrevemos no capítulo seguinte (47, 48).

2.1.1 MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EM QUIMERISMO

A análise de quimerismo pode ser realizada através das sequências repetitivas que se encontram dispersas ao longo do genoma humano. As diferenças genéticas entre dador e doente, são avaliadas em amostras pré transplante e analisadas no pós transplante (49, 50).

Short tandem repeats

Os STRs são sequências repetidas em *tandem*, ao longo do genoma organizadas maioritariamente em repetições de 2 a 6 nucleótidos, como está representado no Quadro 2, e cada unidade pode ser repetida 5 a 30 vezes. São marcadores genéticos altamente polimórficos, podendo variar em tamanho e na sequência primária, usados numa variedade de aplicações incluindo a identificação forense, a reconstrução filogenética e a monitorização de quimerismo (51-53). Acerca de 10 anos foi estabelecido pelos laboratórios forenses uma base de dados denominada- *Combined DNA index system (CODIS*). Foi estipulado para esta base de dados um grupo de 13 STRs, alguns dos quais se tornaram os mais utilizados, nomeadamente o FGA,THO,VWA entre outros (54).

Quadro 2. STRs organizados em repetições de 2 a 6 nucleotídos

Dinucleotídeo	(CA)(CA)(CA)(CA)
Trinucleotídeo	(GCC)(GCC)(GCC)
Tetranucleotídeo	(AATG)(AATG)(AATG)
Pentanucleotídeo	(AGAAA)(AGAAA)
Hexanucleotídeo	(AGTACA)(AGTACA)

Com o aparecimento da técnica de PCR nos finais dos anos 80, a análise e genotipagem dos polimorfismos de STRs tornou-se simples e direta e rapidamente foi eleito o marcador de eleição no mapeamento genómico (54, 55). A pesquisa de STRs utilizando um conjunto de *primers* adequados para estas regiões variáveis do genoma humano, permite a caracterização do ADN para cada indivíduo (56, 57). Um STR utilizado para a análise de quimerismo deve ter pelo menos um alelo diferente no perfil do doente e do dador (49). Para a análise de um doente que apresente quimerismo misto é recomendado a utilização de mais de um STR em simultâneo (58). A Figura 2 exemplifica um caso de QC pós TPH, em que o doente apenas apresenta células do dador, e um caso de QM, em que o doente apresenta células de ambos.

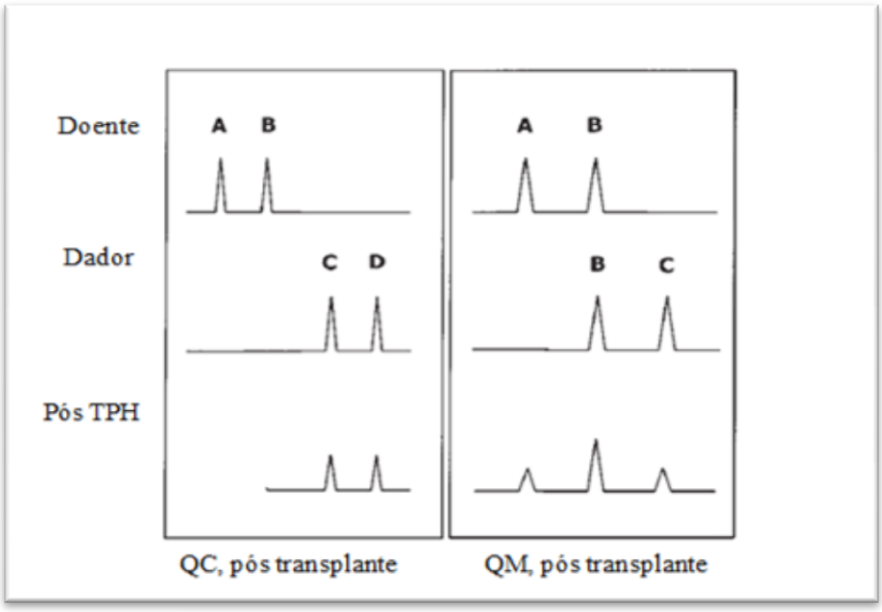


Figura 2. Análise de quimerismo pós TPH (Adaptado de Lamba *et al*, 2004)

Gene da Amelogenina

A amelogenina é uma proteína presente no esmalte dentário humano, cujo gene codificante se encontra nos cromossomas X (Xp22.1-Xp22.3) e Y (Yp 11.2). O gene da amelogenina foi isolado e sequenciado pela primeira vez por *Shimokawa*, em 1989 (Figura 3) (59). É utilizado em larga escala em casos forenses, estudos arqueológicos ou mesmo no diagnóstico pré-natal.

Em casos de dador/doente de sexos diferentes, a informação pode ser obtida através da técnica de PCR por amplificação do gene da amelogenina que está presente em ambos os cromossomas sexuais X e Y (60). Os produtos de PCR serão facilmente distinguidos, pois os *primers* ligam-se na região do primeiro intrão do gene da amelogenina dos cromossomas X e Y e amplificam regiões que diferem no tamanho e na sequência de bases (61). Sendo assim, a presença de dois fragmentos amplificados é indicação do genótipo masculino e apenas um fragmento amplificado é indicação do genótipo feminino. A utilização em simultâneo de STRs e do gene da amelogenina torna os resultados mais informativos (50, 62).

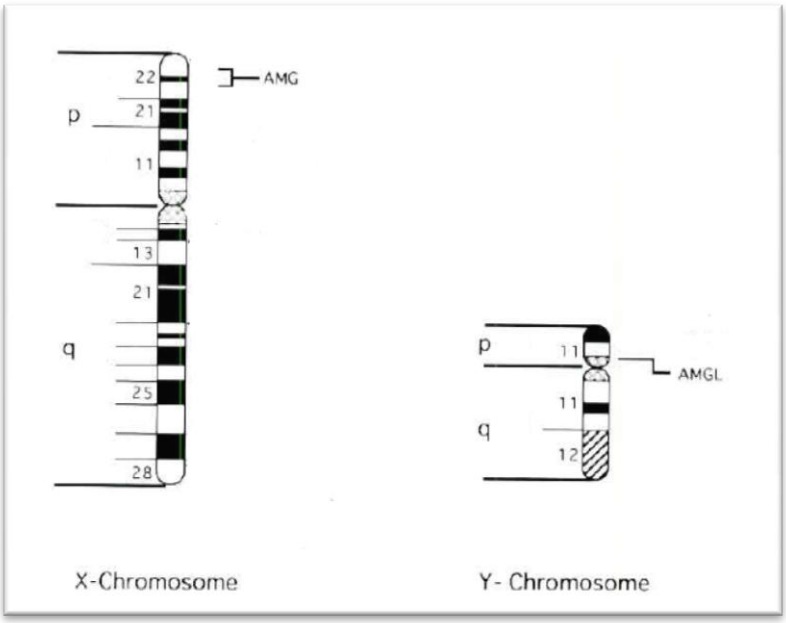
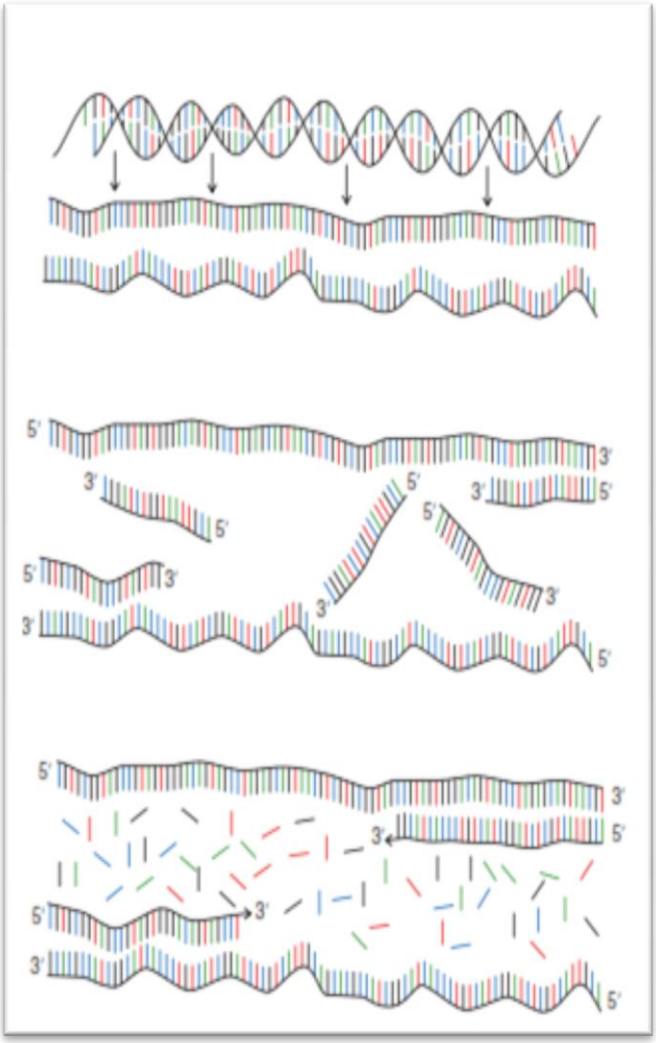


Figura 3. Localização cromossómica do gene da Amelogenina (Adaptado de Sasaki *et al*, 1995)

2.1.2 TÉCNICAS DE PCR E ANÁLISE DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESE CAPILAR

A técnica de PCR consiste na amplificação de fragmentos de ADN *in vitro*. Esta técnica baseia-se na amplificação, isto é, criação de inúmeras cópias de ADN, por replicação enzimática, compreende uma série de ciclos que envolvem desnaturação do ADN, emparelhamento dos *primers* e extensão da cadeia pela enzima polimerase (Figura 4). As vantagens da utilização da técnica incluem a pequena quantidade de ADN necessária para a análise e a alta sensibilidade, sendo uma técnica aplicada em diversas áreas, como a medicina forense, clonagem ou diagnóstico de patologias. Os produtos de PCR podem ser detetados por electroforese em gel de agarose, em que cada fragmento aparece como uma banda cujas dimensões podem ser medidas por comparação a padrões de peso molecular (63, 64).



Desnaturação: A temperatura elevada separa a cadeia dupla de ADN

Emparelhamento: Os *primers*, marcados para cada STR, marcam as extremidades da sequência alvo

Extensão: Após a ligação dos *primers* às sequências complementares de ADN, a temperatura eleva-se e a enzima taq polimerase replica a cadeia de ADN. O processo de síntese é iniciado onde estão ligados os *primers*, incorporando os nucleotídos complementares à sequência alvo através dos dNTPs (desoxinucleotídeos tri-fostato)

Figura 4. Ciclo de reacção de PCR (Solomons *et al*, 2011)

A análise de fragmentos por electroforese capilar determina o tamanho específico de cada produto de PCR, construindo um perfil que é único para cada indivíduo. Os produtos de PCR marcados por fluorocromos são detectados por um feixe de laser, mediante o tamanho em pb, a informação é recolhida e analisada por um *software*. Durante todo o procedimento de análise de fragmentos, o *software* verifica todos os componentes de qualidade para cada uma das amostras e para os genótipos associados a estas. Tal como visualizamos na Figura 5, os STRs apresentam diferentes tamanhos em pb, o que permite a sua distinção (37, 65, 66).

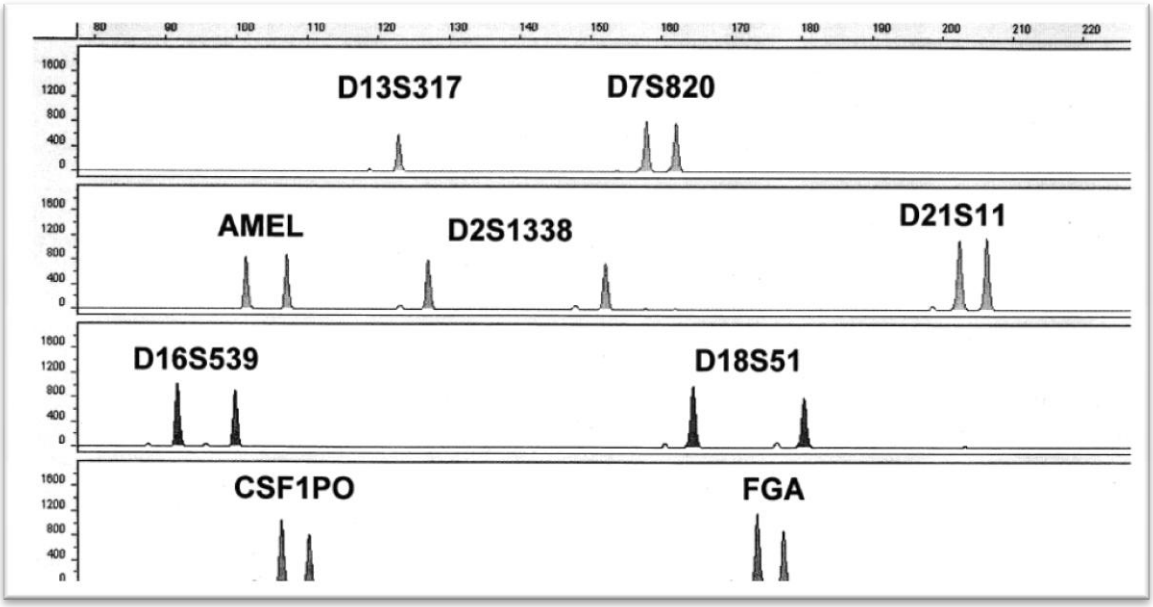


Figura 5. Análise de fragmentos por electroforese capilar. Os produtos de PCR diferenciam-se por tamanho em pb (Adaptado de Hill *el al*, 2007)

OBJETIVOS

1. ESTADO DE ARTE E OBJETIVOS DO TRABALHO

O número de Alo-TPH realizados um pouco por todo o mundo tem vindo a aumentar nos últimos anos (67). A análise de quimerismo, através de técnicas moleculares, tornou-se uma ferramenta de monitorização indispensável na vigilância dos doentes transplantados (68). Proporciona a indicação precoce da rejeição do enxerto ou um alerta oportuno para uma iminente recaída do doente. A amplificação de STRs por PCR para análise de quimerismo pode ser uma das técnicas aplicadas à vigilância e diagnóstico de rotina pós transplante. Contudo, a heterogeneidade das técnicas para a análise de quimerismo e a diversidade de STRs utilizados, podem comprometer a comparação dos resultados gerados em diferentes centros de transplante (69). Estudos colaborativos entre alguns países europeus detetaram a necessidade de padronizar as metodologias, fornecendo uma base para o controlo de qualidade na análise de quimerismo.

O presente estudo teve como principais objetivos:

1. Monitorizar o estado de quimerismo dos doentes pós Alo-TPH, definindo se o novo sistema hematopoético é de origem do doente ou do dador, identificando possíveis casos de rejeição ou falência de enxerto.

2. Comparar duas técnicas moleculares para avaliação do estado de quimerismo pós Alo-TPH: amplificação de STRs e amplificação do gene da amelogenina em pares dador/doente de sexos diferentes, pela técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

1.POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população em estudo foi constituída por 24 doentes transplantados no IPO-Porto, entre novembro de 2011 a janeiro de 2013. A amostra utilizada para análise de quimerismo foi sangue periférico colhido em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após o transplante, os doentes foram seguidos e o sangue foi colhido ao fim de 1, 3, 6 e 12 meses.

2. MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS: CÉLULAS MONONUCLEARES E GRANULÓCITOS

Das amostras de sangue foi efetuado um enriquecimento de leucócitos utilizando Tetraspan 60,0 mg/mL (amido de Poli, O-2-hidroxietilo) que funciona como agente de sedimentação. Todo o sobrenadante rico em leucócitos foi transferido para tubos com cerca de 6 mL de Ficoll (*Lymphoprep®, Axis Shield*) que foram centrifugados durante 20 minutos a 400 x g. Foi recolhida a camada de células mononucleares para outro tubo onde se adicionou PBS. No mesmo tubo ficaram os granulócitos com alguns glóbulos vermelhos, os quais foram lisados com 4,5 mL de água e, no final, foi adicionado 0,5mL de PBS 10x para restabelecer a osmolaridade. Todos os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 400 x g. As células foram armazenadas a 4ºC, para posterior extracção de ADN.

2.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADN

A extração de ácidos nucleicos foi realizada a partir de 100µL de amostra das subpopulações celulares separadas utilizando o *QiAmp DNA Micro Kit (Qiagen).*

O Protocolo de extração foi o seguinte:

100 µL amostra

100µL de *Buffer* AL

10 µl de proteinase K

⬇

Vortéx

⬇

Incubar a 56°C, 10 minutos

⬇

50 µL de etanol (96-100%)

⬇

Vortéx

⬇

Incubar à temperatura ambiente durante 3 minutos

Transportar o lisado da coluna sem molhar a banda

⬇

Centrifugar 6000 x g, 1 minuto

Lise

As amostras foram lisadas em condições de alta desnaturação a elevadas temperaturas na presença da proteinase K.

Ligação

Para permitir uma ligação de ADN para a membrana foi adicionado *Buffer* AL. As condições salinas e de pH asseguram que as proteínas e outros contaminantes são eluídos, não ficando retidas na membrana da coluna.

Primeira lavagem 500 µL *Buffer* AW1

Segunda lavagem 500 µL *Buffer* AW2

⬇

Centrifugar a primeira e a segunda lavagem a 6000 x g, 1 minuto

⬇

Para secar a membrana centrifugar a 20000 x g, 3 minutos

⬇

100 µL *Buffer* AE e incubar 15-25°C, 1 minuto

⬇

Centrifugar 20000 x g, 1 minuto

Lavagem

Enquanto os ácidos nucleicos permanecem ligados à coluna da membrana, os contaminantes foram lavados inicialmente com *Buffer* AW1 e depois com *Buffer* AW2.

Eluição

O ADN foi eluído a partir das colunas, usando um pequeno volume de *Buffer* AE.

Após a extração, foi efetuada a quantificação de ADN através da leitura da absorvância no aparelho NanoDrop 1000. Pipetou-se 2-3 µL de água desionizada, para limpar ambas as superfícies óticas e este processo foi repetido para cada amostra. No *software* de aplicação foi selecionado o aplicativo de ácido nucleico e realizada uma medição em branco dispensando 1 µL de tampão para a superfície ótica inferior. De seguida, foi dispensado para o pedestal inferior 1 µL de amostra e, no *software*, ao selecionar "*Measure*", este calculou automaticamente a sua concentração e o grau de pureza dos ácidos nucleicos.

2.3 ANÁLISE DE QUIMERISMO POR AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS, STRS E GENE DA AMELOGENINA

Identificação dos STRs informativos

Em todos os pares dador/doente foi identificado qual o STR mais informativo, ou seja, aquele que possui pelo menos 4 pb de diferença entre dador e doente, permitindo distingui-los.

No 1º teste de identificação, os STRs escolhidos foram: THO, VWA, F131, FES, D11S. No caso destes 5 STRs não serem informativos para um determinado par dador/doente, realiza-se um 2º teste de identificação, analisando os STRs, FGA e HPRT.

No período pós transplante foram analisados os seguimentos dos doentes, utilizando o STR mais informativo. A análise do gene da amelogenina foi realizada nos pares dador/doente de sexos diferentes. No Quadro 3 apresenta-se a descrição dos STRs utilizados, para a avaliação de quimerismo (31, 36, 51, 70).

2.3.1 TÉCNICA DE PCR

A análise dos STRs foi realizada pela da técnica de PCR, utilizando *primers* específicos para cada STR. A reação foi efetuada num termociclador programável, num volume total de 25,0 µL, constituído por 2,5 µL de ADN e 22,5 µL de mistura reativa. A mistura reativa consistiu em, 1U *Taq* DNA Polimerase, o respetivo tampão de reação 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs e 0,2 µM de *primers* específicos. (Ver anexos-protocolos laboratoriais).

STRs

As condições de amplificação dos STRs foram as seguintes: pré-desnaturação durante 10 minutos a 95ºC, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94ºC, 45 segundos a 54ºC e 1 minuto a 72ºC, com um passo de extensão final de 15 minutos a 72ºC.

Gene da Amelogenina

Para a amplificação do gene da amelogenina as condições da mistura de reação foram as descritas para os STRs. As condições foram: pré-desnaturação durante 10 minutos a 94ºC, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 60ºC e 1 minuto a 72ºC, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72ºC.

Como controlo de qualidade do ensaio de PCR, foram incluídos controlos negativos em todas as reações de PCR, substituindo o ADN da amostra por água bidestilada estéril (dd_{H2O}). (Ver anexos-protocolos laboratoriais).

Quadro 3. Descrição dos STRs utilizados; localização cromossómica e sequência dos *primers**

STRs	Localização Cromossómica	Sequência dos *Primers*
VWA	12p13.31	5'-CCCTAGTGGATAAGAATAATC-3' 5-'GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'
THO	11p15.5	5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'
F131	6p24-p25	5’-GAGGTTGCACTCCAGCTTT-3’ 5’-ATGCCATGCAGATTAGAAA-3’
FES	15q25-qter	5’-GGGATTTCCCTATGGATTGG-3’ 5’-GCGAAAGAATGAGACTACAT-3’
D11S	11q24.1-25	5’-GGTAGCAGAGCAAGACTGTC-3’ 5’-CACCTTCATCCCTAAGGCAGC-3’
FGA	4q31.3	5'GCCCCATAGGTTTTGAACTCA-3' 5'-TGATTTGTCTGTAATTGCCAGC-3'
HPRT	Xq.26-27	5’-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3’ 5’-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3’
AMELOGENINA	X: p22-1-22.3 Y: p11.2	5’-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3’ 5’-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3’

*Designação dos STRs atribuído pelo CODIS (54)

2.3.2 ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

De modo a verificar a amplificação do fragmento de ADN, 11µL dos produtos obtidos na PCR foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1,5% (1,5 g de agarose com 100 mL de TBE), corados com 5 µL brometo de etídeo e visualizados num transiluminador de UV. Para determinar os pesos moleculares dos produtos obtidos na PCR, utilizou-se um marcador molecular de 50 pb.

2.3.3 ANÁLISE DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESE CAPILAR

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese capilar no sequenciador automático da *Applied Biosystems*, ABI3130 *Genetic Analyser*. Utilizamos 0,15 µL do produto de PCR diluído na mistura reativa de 15 µL de formamida HiDi e 0,3 µL de GS 500 Liz. O *software GeneMapper* v3.7(2) foi o utilizado para a análise de resultados. (Ver anexos- protocolos laboratoriais).

Os *primers* utilizados estavam marcados com fluorocromos, permitindo a visualização de picos de fluorescência. Os picos corresponderam aos alelos do doente e do dador. A análise do tamanho destes fragmentos foi utilizada para identificar o polimorfismo entre indivíduos.

RESULTADOS

1. GRUPO DE DOENTES TRANSPLANTADOS

As características dos doentes e patologias encontram-se descritas no Quadro 4. Na maioria dos doentes foi diagnosticado leucemia (62,5%) e os restantes outras doenças hematológicas (37,5%). A média de idades dos doentes foi de 49 anos, variando entre 22 e 61 anos de idade.

Quadro 4. Características dos doentes e dos seus transplantes

Características **Doentes n = 24**	
Género	
Masculino	13
Feminino	11
Idades	
Média	49
Intervalo de idades	(22-61)
Diagnósticos	
Leucemias Agudas	8
Leucemias Crónicas	7
*Outras doenças Hematológicas	9

*** (Síndrome mielodisplásico, Anemia Aplástica, Mielofibrose, Mieloma Múltiplo ** e Linfoma não-Hodgkin **).**
**** (Os doentes com as patologias Mieloma Múltiplo e Linfoma não-Hodgkin realizaram transplante alogénico após transplante autólogo).**

A maioria dos doentes foi submetida a transplante em 2012, e o respetivo período de seguimento foi em 2013. A análise do gene da amelogenina foi realizada retrospetivamente nos doentes com dador de sexo oposto.

O isolamento das populações de leucócitos: CMN e GRAN foi realizado em todas as amostras de sangue periférico, sendo possível em todas as amostras a extração de ADN. No Quadro 5, está representada a quantificação de ADN numa amostragem de 5 pares de dador/doente. O valor de *ratio* estava de acordo com a literatura, com valores compreendidos entre 1,8-2,0. A quantidade de ADN extraído foi bastante variável, dependendo da quantidade de sangue utilizado, suficiente para os testes realizados e armazenamento para análise do seguimento dos doentes.

Quadro 5. Quantificação de ADN nas frações de CMN e GRAN

	Doentes (n = 5)		Dadores (n = 5)	
	CMN (ng/µL)	**GRAN (ng/µL)**	**CMN (ng/µL)**	**GRAN (ng/µL)**
Mediana	35,6	22,1	57,7	14,2
Intervalo	12,6-158,4	6,5-63,1	5,6-168,5	7,1-46,7

2. STR – PCR E ANÁLISE DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESE CAPILAR

A análise dos STRs informativos foi realizada utilizando a técnica de PCR. Foi possível confirmar a amplificação de fragmentos de ADN, através da electroforese em géis de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo. A Figura 6 representa um gel de agarose, com a presença de bandas de tamanho apropriado em cada reacção de PCR (A), confirmando a amplificação dos produtos de PCR, e o controlo negativo não apresentava banda (B).

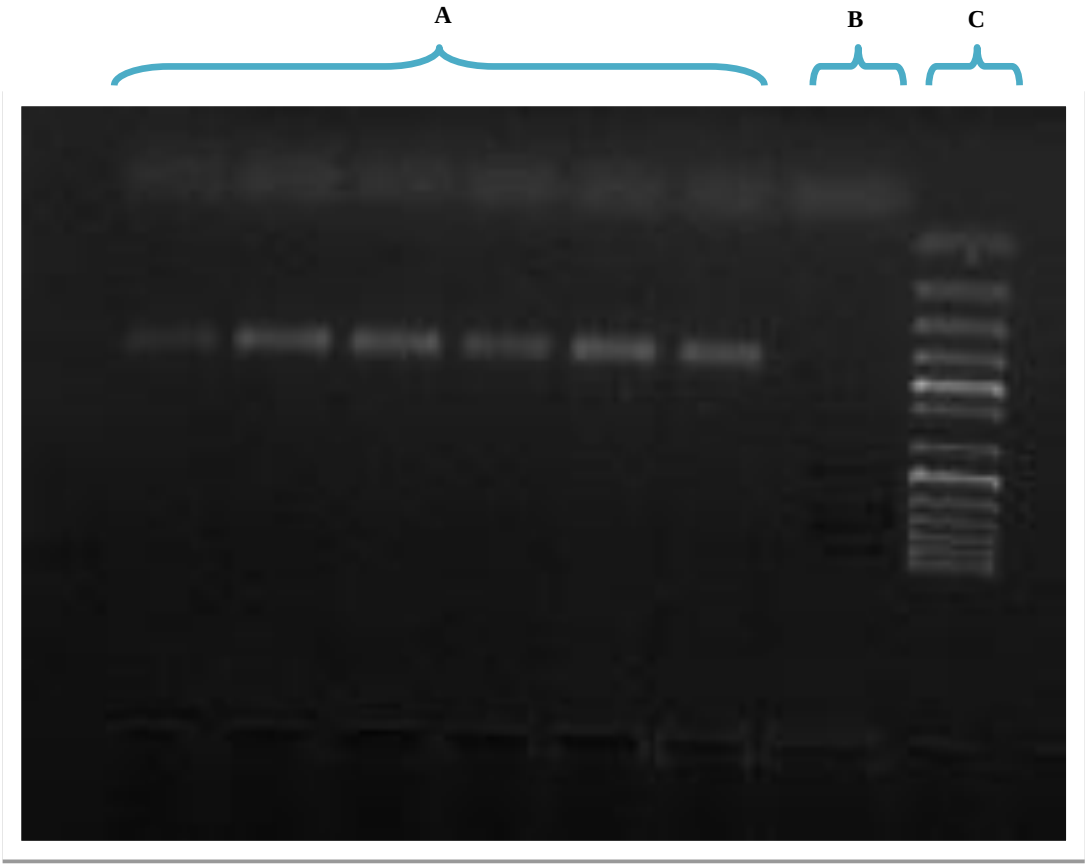


Figura 6. Gel de agarose a 1,5%; (A) Análise dos produtos de PCR com o STR informativo D11s; (B) Controlo negativo; (C) Marcador Molecular de 50 pb

2.1 STR INFORMATIVO

Para determinar qual o STR informativo para todos os pares dador/doente, foram analisados 7 STRs: D11s, F131, THO, VWA, FES, FGA e HPRT.

Os STRs informativos são aqueles que apresentam diferenças de pelo menos 4 pb entre o dador e o doente. A análise do tamanho dos fragmentos, por electroforese capilar, foi utilizada para identificar o polimorfismo entre indivíduos. No Quadro 6, está representado o tamanho dos fragmentos em pb, de todos os STRs. Os tamanhos dos fragmentos encontrados foram idênticos aos valores apresentados na literatura (8,16,17,26).

Quadro 6. Tamanho dos fragmentos em pares de base

STRs	VWA	THO	F131	FES	D11s	FGA	HPRT
Tamanho (pb)	145-170	180-195	178-193	210-228	205-251	183-203	276-288

Na população em estudo, no 1º teste de identificação do STR informativo, 10 pares (41,7%) tiveram 1 STR informativo, 11 pares (45,8%) tiveram 2 STRs informativos e 3 pares (12,5%) tiveram 3 ou mais STRs informativos. Para a maioria dos pares dador/doente, o número STRs informativo foi de 2, variando de 1 a 4 (Figura 7).

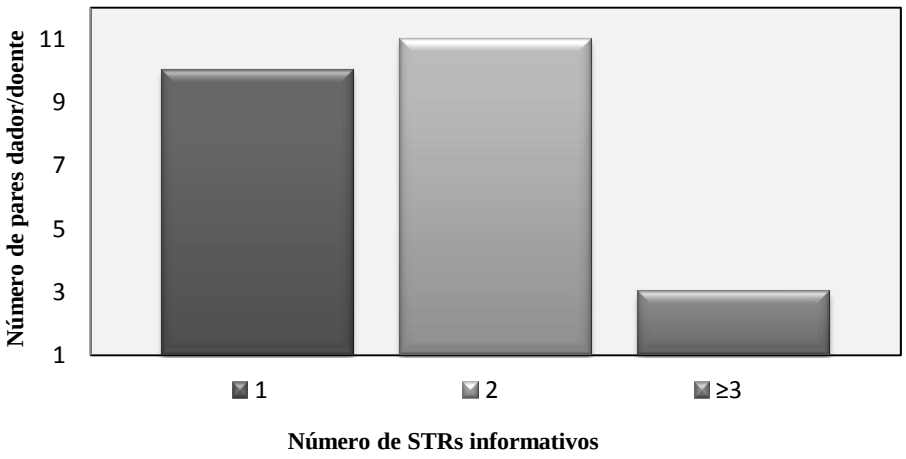


Figura 7. STRs informativos por par dador/doente

Para 1 par dador/doente (4,17%), no 1º teste não foi identificado nenhum STR informativo, sendo necessário um 2º teste de identificação, em que utilizámos os STRs, FGA e HPRT. Para este par dador/doente, tanto o FGA como o HPRT mostraram ser informativos.

Na Figura 8, está representada a identificação do STR informativo num par dador/doente em estudo. Os STRs informativos foram o D11s e o FES. O D11s foi o mais informativo, pois existe uma diferença de 45 pb entre os picos do dador e os do doente, enquanto no FES, diferem apenas em 4 pb. Verificou-se que para todos os outros STRs: F131, THO e VWA, não houve diferenças de pb entre os picos do dador e os do doente.

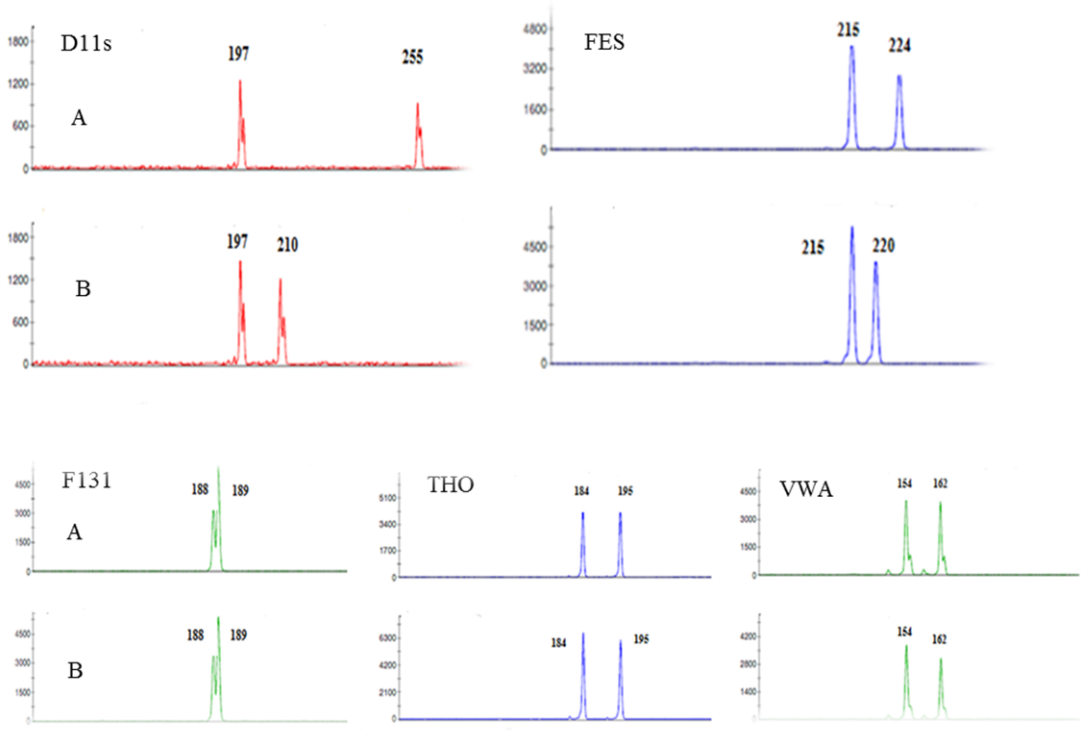


Figura 8. STRs informativos num par dador/doente; (A) Dador; (B) Doente

No 1º teste de identificação em 3 pares dador/doente, identificaram-se 3 ou mais STRs informativos. A Figura 9 exemplifica um par dador/doente com 4 STRs informativos, sendo o D11s o mais informativo, pois existe uma diferença de 14 pb entre os picos do dador e os do doente. O THO é o menos informativo pois apenas existe uma diferença de 4 pb.

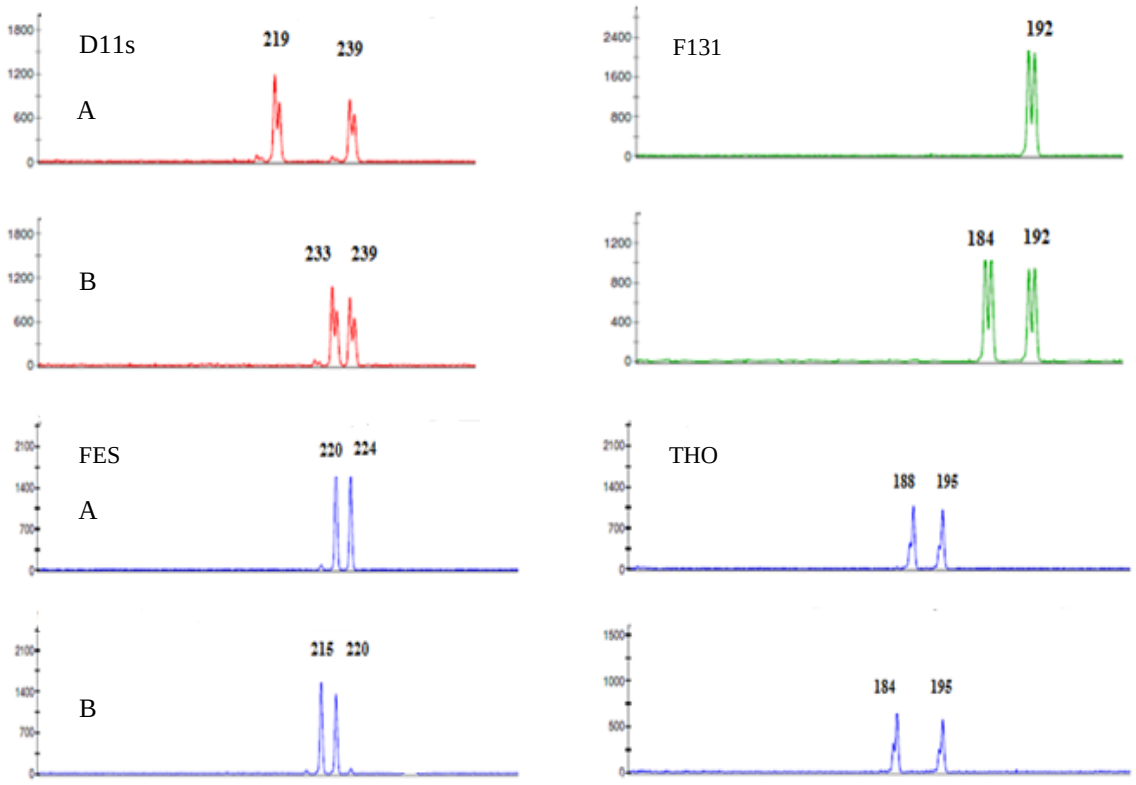


Figura 9. Exemplo de um par dador/doente com 4 STRs informativos; (A) Dador; (B) Doente

2.2 FREQUÊNCIA DOS STRS INFORMATIVOS

Para os pares dador/doente com um único STR informativo, o F131 identificou 3 pares, seguido dos D11s, THO e FES que identificaram 2 pares. O *primer* VWA foi identificativo para apenas 1 par (Figura 10).

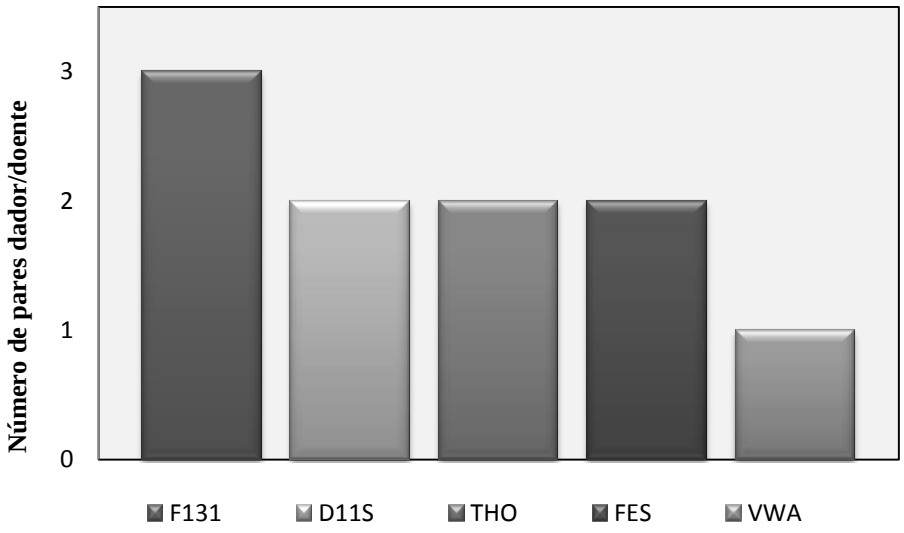


Figura 10. Pares dador/doente com um STR informativo

Na população estudada, o D11s foi o STR informativo para um maior número de pares dador/doente (n = 11), seguido dos F131, THO e FES (n = 8) e, por fim, o VWA (n = 5) (Figura 11).

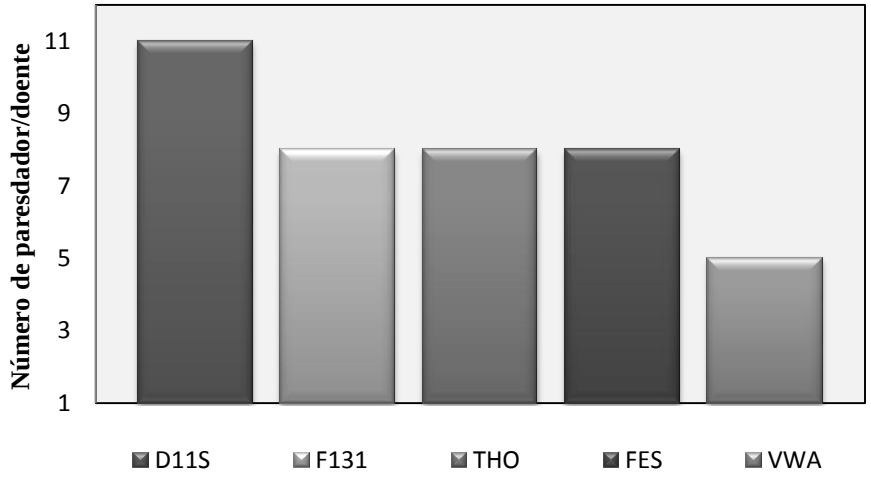


Figura 11. Frequência de cada um dos STRs como identificador de pares dador/doente

3. AVALIAÇÃO DE QUIMERISMO

3.1 TEMPO MÉDIO DOS SEGUIMENTOS DOS DOENTES PÓS ALO-TPH

Este estudo foi efetuado numa fase de implementação da avaliação do quimerismo nos doentes no IPO-Porto. Por este motivo nem todos os doentes foram avaliados desde o início do transplante. Foram feitas determinações simultâneas sempre que possível e os resultados foram concordantes com os realizados em outro centro de referência.

Os doentes avaliados neste trabalho tiveram um seguimento médio de 6 meses, variando entre 1 e 12 meses. A análise do quimerismo dos doentes foi efetuada ao fim do primeiro mês (n=9), ao terceiro mês (n=12), ao sexto mês (n=15) e ao final de um ano (n=3).

3.2 AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO NOS DOENTES SUBMETIDOS A ALO-TPH

No 1º mês pós Alo-TPH, dos 24 doentes em estudo, foram analisados 9 doentes, dos quais 8 apresentaram QC nas CMN e nos GRAN e 1 apresentou QM apenas nas CMN e QC nos GRAN (Figura 12).

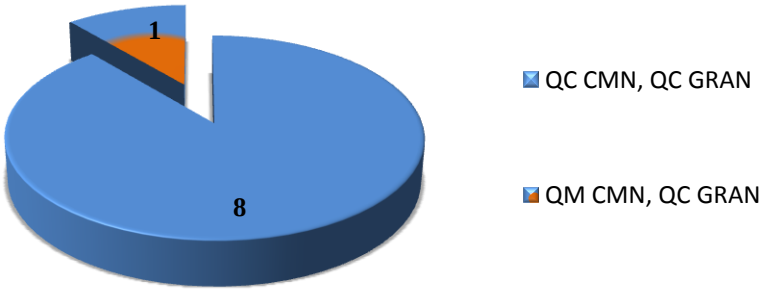


Figura 12. Quimerismo dos doentes, no 1º mês, pós transplante

Ao 3º mês, pós Alo-TPH, foram analisados 12 doentes: 9 apresentaram QC nas CMN e nos GRAN e 3 apresentaram QM. Dos 3 doentes com QM, 2 apresentaram QM nas CMN e nos GRAN e 1 apresentou QM apenas nas CMN e QC GRAN (Figura 13).

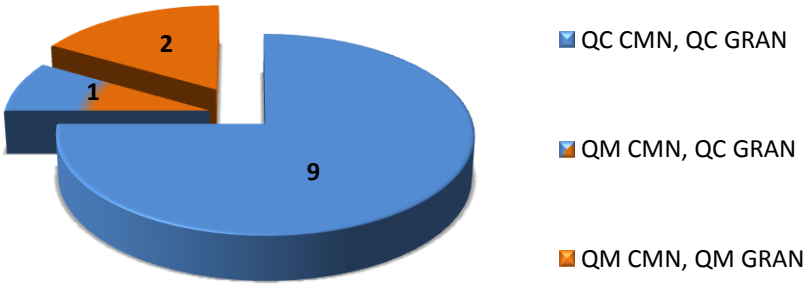


Figura 13. Quimerismo dos doentes, no 3º mês, pós transplante

Ao 6º mês foram analisados 15 doentes, 13 apresentaram QC nas CMN e nos GRAN e 2 apresentaram QM. Dos 2 doentes com QM, ambos já tinham sido avaliados ao 3ºmês, 1 apresentou QM nas CMN e nos GRAN e 1 apresentou QM nas CMN e QC GRAN (Figura 14). No 12º mês pós Alo-TPH, foram analisados 4 doentes e todos os doentes apresentaram QC nas CMN e nos GRAN.

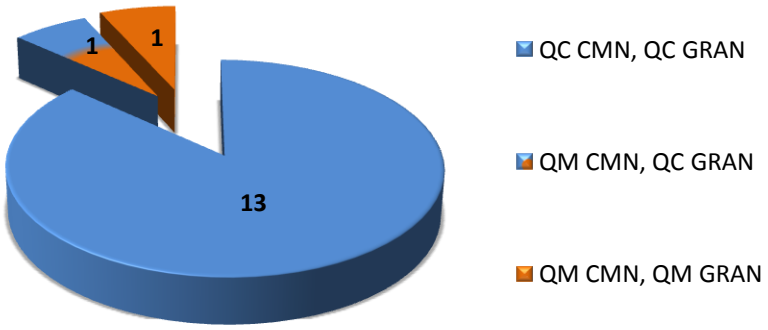


Figura 14. Quimerismo dos doentes, no 6º mês, pós transplante

3.2.1 Seguimento dos doentes com Quimerismo Completo

Na Figura 15, está representado o seguimento dos doentes (n=20) que apresentaram sempre QC no período pós transplante. Destes 20 doentes, 11 (55,5%) foram avaliados em dois intervalos de tempo e apenas 1 doente foi avaliado em três intervalos de tempo. Para a maioria dos doentes, o número de vezes em que foi analisado o quimerismo foi de 2, variando entre 1 a 3.

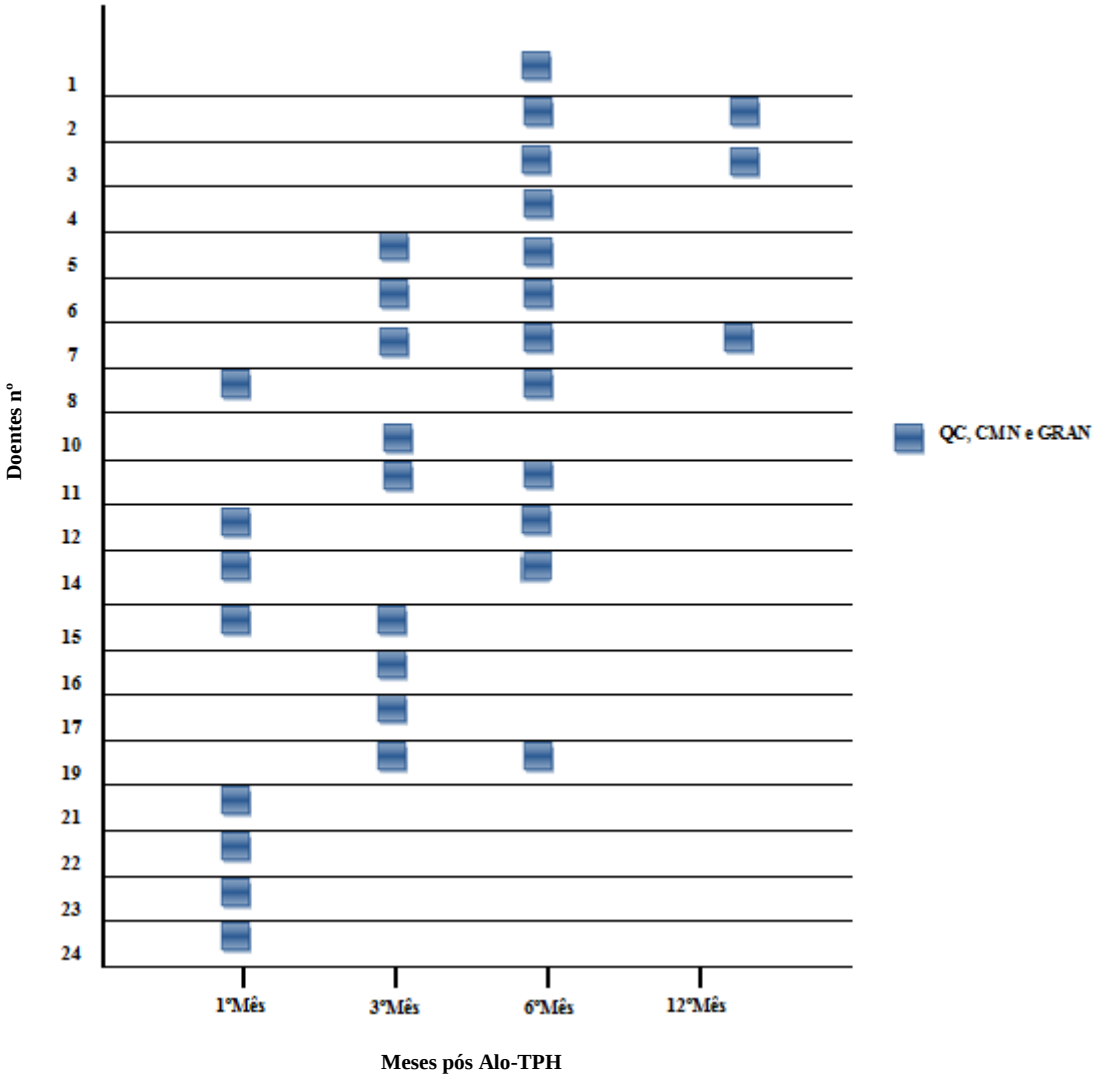


Figura 15. Seguimento dos doentes com Quimerismo Completo

Um exemplo de um dos doentes que apresentou QC, está exemplificado na Figura 16. No 1º mês pós transplante, há QC nas CMN e nos GRAN.

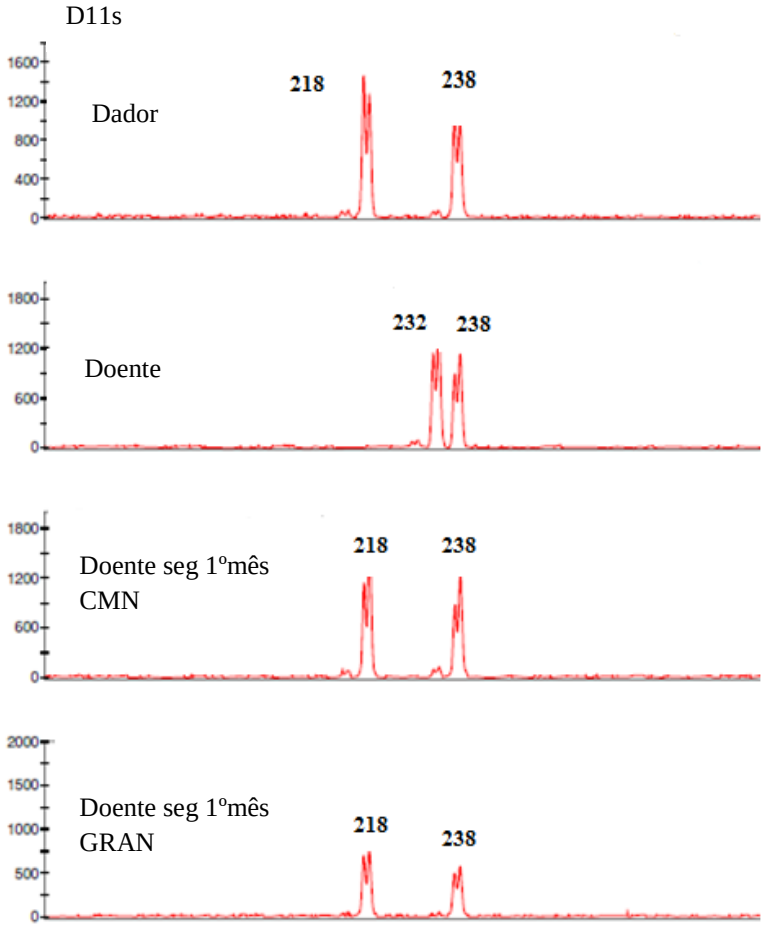


Figura 16. Exemplo de um doente com QC nas CMN e nos GRAN

3.2.2 Seguimento dos doentes com Quimerismo Misto

Os doentes que apresentaram QM foram os doentes 9, 13, 18 e 20. Três doentes iniciaram a avaliação de quimerismo ao 3º mês e apresentaram QM: 1 doente com QM nas CMN e QC nos GRAN e 2 doentes com QM nas CMN e nos GRAN. Ao 6º mês, 2 doentes evoluíram para QC nas CMN e nos GRAN e 1 doente manteve QM nas duas populações. Ao 12º mês, o doente 9 manteve o mesmo estado de QC apresentado ao 6º mês. O doente 20 foi apenas avaliado ao 1º mês e apresentou QM nas CMN e QC nos GRAN (Figura 17).

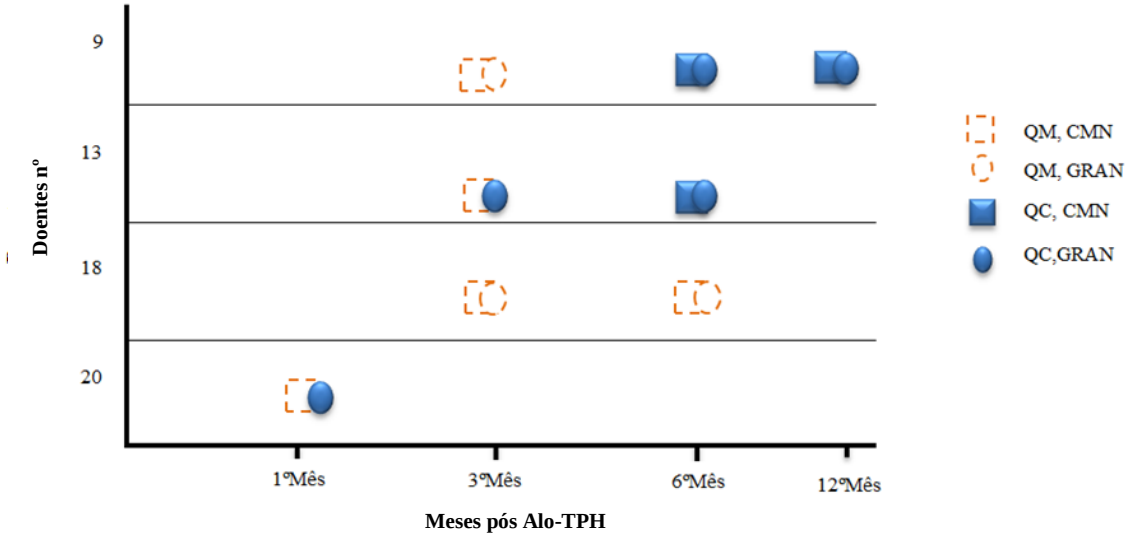


Figura 17. Seguimentos dos doentes com Quimerismo Misto

Na Figura 18, é possível seguir a evolução do doente 13, de um estado de QM para QC. O doente apresentou, ao 3º mês pós transplante, QM nas CMN e QC nos GRAN. Ao 6º mês, este doente, apresentou QC nas CMN e nos GRAN.

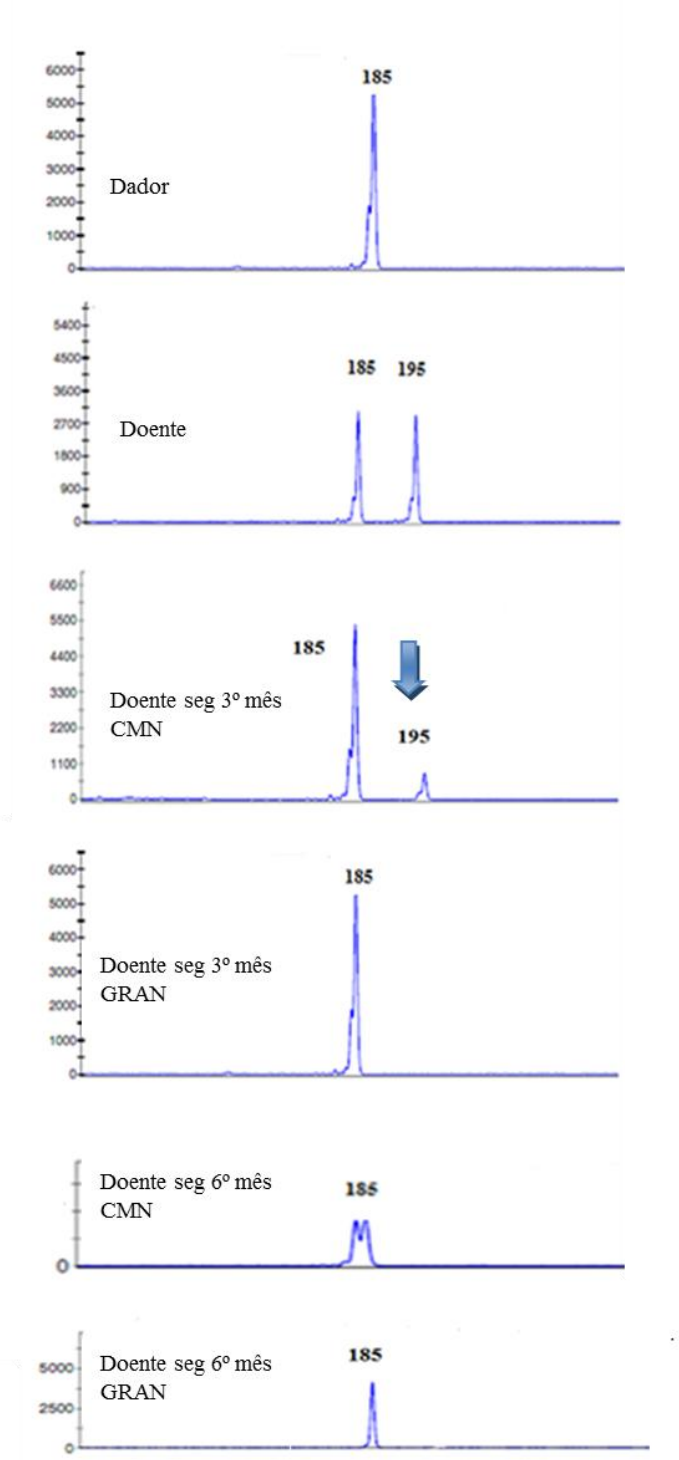


Figura 18. Exemplo de um doente com QM que evolui para QC (a seta indica o QM com a presença de células do doente ao 3ºmês pós transplante)

4. AMELOGENINA COMO INDICADOR DE QUIMERISMO ENTRE INDIVÍDUOS DE SEXOS DIFERENTES

Em 14 pares dador/doente de sexos diferentes, foi analisado o gene da amelogenina, para a avaliação do quimerismo. A presença de dois fragmentos amplificados pertence ao genótipo masculino (XY) e apenas um fragmento amplificado pertence ao genótipo feminino (XX) (Figura 19).

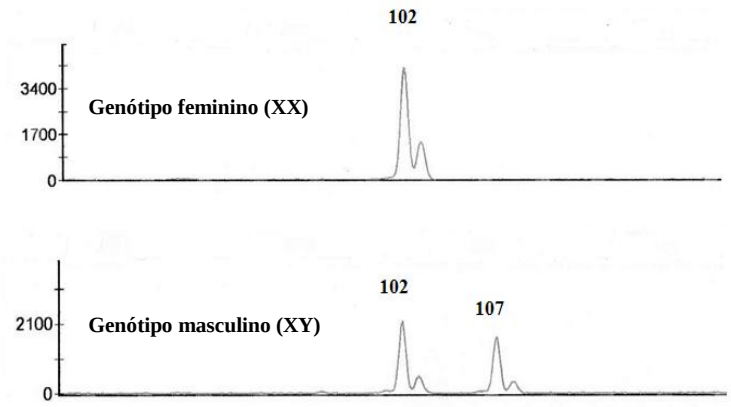


Figura 19. Análise de fragmentos do gene da amelogenina, em que o dador é do sexo feminino e o doente do sexo masculino

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE AMELOGENINA E STRS PARA IDENTIFICAÇÃO DE QUIMERISMO

Ambas as técnicas de análise de quimerismo, STRs e amelogenina, foram informativas e deram resultados que forneceram informação concordante. Dos 2 doentes que apresentaram QM, um doente foi analisado em três intervalos de tempo e o outro doente foi analisado apenas num intervalo de tempo. A Figura 20 exemplifica os seguimentos dos doentes, que apresentaram sempre QC e foram avaliados utilizando os STRs e o gene da amelogenina.

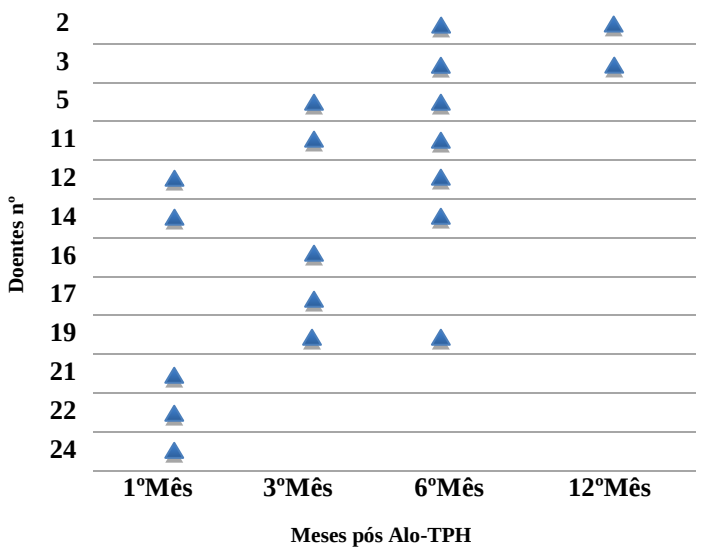


Figura 20. Seguimento dos doentes que realizaram análise de quimerismo por STRs e Amelogenina e apresentaram sempre QC

Está exemplificado na Figura 21, a evolução de QM nas CMN e nos GRAN para QC nestas subpopulações no doente 9. O quimerismo deste doente foi analisado pelo gene da amelogenina e pelo STR informativo F131. No primeiro seguimento do doente, ao 3º mês pós transplante, este apresentou QM, com dois fragmentos amplificados na análise do gene da amelogenina. No entanto, evolui para um QC, ao 6º e 12º mês pós transplante, apresentando apenas um fragmento amplificado.

A análise de fragmentos do gene da amelogenina e do STR informativo D11s, na Figura 22, permitiu confirmar o QC nas CMN e nos GRAN, ao 3º mês pós transplante do doente 3.

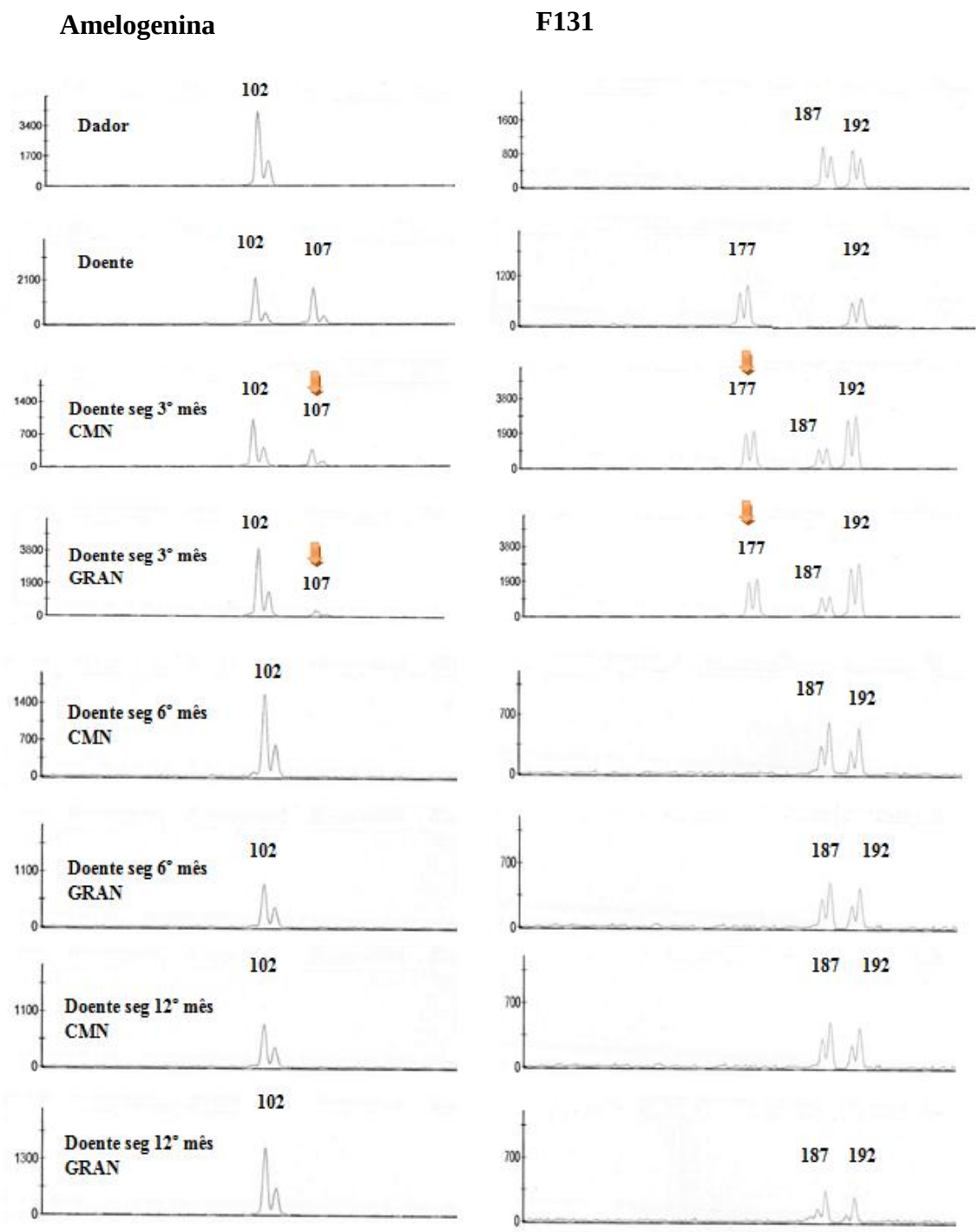


Figura 21. Análise de fragmentos do gene da amelogenina e do STR F131 do doente 9 para identificação de quimerismo (as setas indicam o QM ao 3º mês pós transplante)

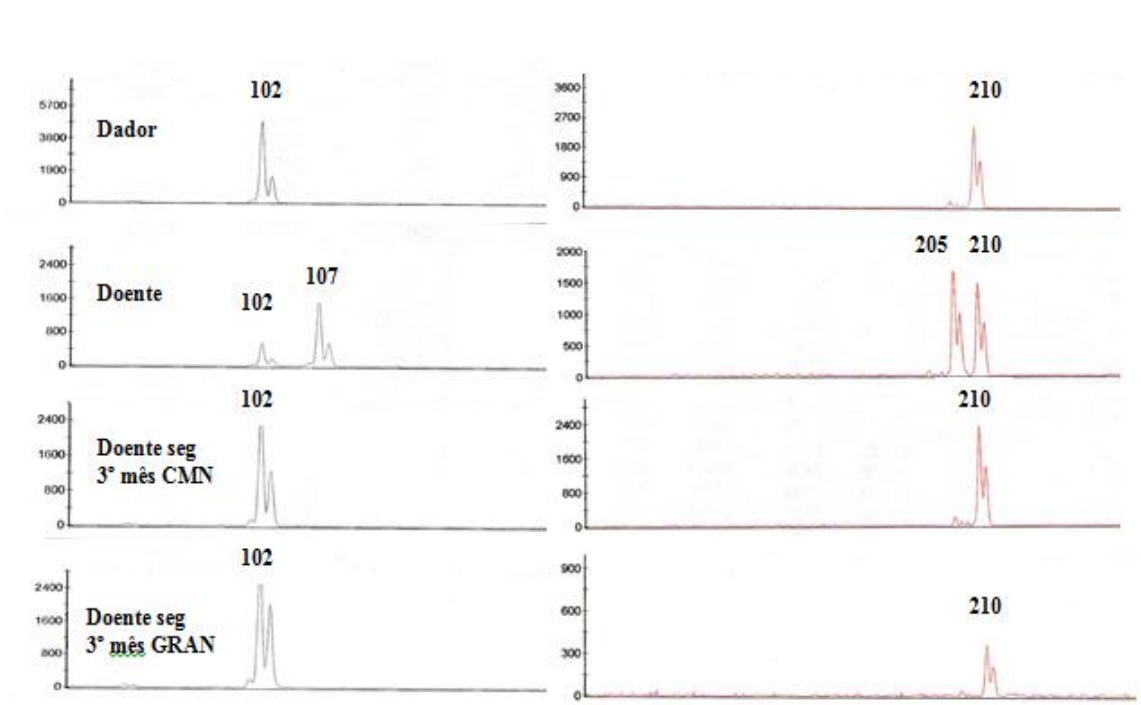


Figura 22. Análise de fragmentos do gene da amelogenina e do STR D11s para a identificação de quimerismo. O doente apresentou QC nas CMN e nos GRAN, ao 3ºmês pós transplante

DISCUSSÃO E CONCLUSÂO

1. AVALIAÇÃO DE QUIMERISMO DOS DOENTES NO PERÍODO PÓS TRANSPLANTE

Nos protocolos de transplantação hematopoiética, durante muitos anos, foram utilizados condicionamentos mieloablativos. Este tipo de condicionamento promove a indução da deleção total das células T do doente. No entanto, devido ao nível elevado de toxicidade e a imunossupressão severa associada a este tratamento, não é aconselhado em doentes com idades avançadas ou que se encontrem em débeis condições clínicas. Estratégias clínicas mais recentes, com regimes de condicionamento não mieloablativos, aumentam a tolerância do doente para o enxerto, permitindo o estabelecer de um estado de QM, que posteriormente evoluirá para QC. Issa *et al* e Pasquet *et al* são defensores desta estratégia clínica (38, 71). No entanto, permanece controversa, entre os investigadores, a indução de QM como terapia para uma possível abolição da doença, particularmente na linhagem das células T.

De acordo com as recomendações de vários centros internacionais, a monitorização de quimerismo deve ser realizada em curtos intervalos de tempo, para permitir uma intervenção precoce, numa possível recaída do doente. As intervenções possíveis podem ser: a imunossupressão, a infusão de linfócitos do dador ou mesmo o alerta necessário para a realização de um segundo transplante (20,72).

No presente trabalho, a técnica utilizada para avaliar o quimerismo dos doentes no período pós transplante foi a amplificação de STRs e do gene da amelogenina por PCR. A estratégia adotada no nosso estudo passou pela realização de testes de escolha do STR informativo. Numa primeira fase realizou-se um teste de identificação analisando os seguintes STRs: D11s, F131, THO, VWA e FES. Apenas se realizaria um 2º teste de identificação, com os STRs FGA e HPRT, caso o 1º teste não fosse informativo, sendo uma estratégia economicamente mais rentável. Devido ao facto de estes STRs serem altamente polimórficos, têm sido utilizados em estudos semelhantes para a detecção de quimerismo (36, 53, 58).

Nos 24 pares de dador/doente, foi realizado o 1º teste de identificação do STR informativo e, para 23 pares dador/doente (95,8%), este foi suficiente, ou seja, apenas foi realizado o 2º teste de identificação para 1 par dador/doente. A percentagem de STRs informativos foi de 95,8%, idêntica aos resultados apresentados por Odriozola *et al* (49). No entanto, a diversidade genética pode variar com o tipo população e o nosso estudo analisa estas alterações genéticas. Os resultados revelaram que para a maioria dos pares dador/doente, o número de STRs informativos foi de 2. Existem artigos que apontam 2 a 4 STRs informativos por par dador/doente, resultados idênticos aos apresentados (49, 53).

De todos os STRs utilizados, o D11s foi o que apresentou uma maior variabilidade genética, pois foi informativo para 11 pares dador/doente. O STR que apresentou menor frequência foi o VWA, sendo informativo para apenas 5 pares. Nos ensaios realizados, os STRs apresentaram o tamanho dos fragmentos em pares de base, idêntico aos valores apresentados na literatura. As pequenas oscilações podem estar relacionadas, possivelmente, com o uso de *primers* adquiridos em diferentes fornecedores ou a variações genéticas entre populações. O tamanho dos fragmentos, em pares de bases, do gene da amelogenina apresentou valores idênticos aos da literatura, 102 pb e 107 pb para os cromossomas X e Y, respectivamente (50, 52).

Alguns investigadores defendem a realização da análise de quimerismo nos doentes no período pós transplante, com *kits* comerciais que incluem um maior número de STRs (7, 27). Contudo, apesar de terem muitos STRs, pode não ser a estratégia mais vantajosa, dado que nem todos os STRs são informativos, nas diferentes populações (49). A técnica de amplificação de STRs por PCR é considerada uma técnica qualitativa e quantitativa, mas a precisão deste método pode, no entanto, ser prejudicada pela presença de picos *stutter* (63). Estes picos são artefatos resultantes da amplificação dos STRs, caracterizados pela presença de uma unidade de repetição mais curta em relação ao alelo principal. A presença destes picos pode levar a erros de diagnóstico na avaliação do estado de quimerismo do doente.

No seguimento de um doente, o aparecimento de um pico com os mesmos pares de bases do doente, pode indicar um falso quimerismo misto (21, 41, 55). Uma possível

alternativa é a quantificação dos picos, sugerida por Ding-Ping Chen *et al* (41), com a indicação de fórmulas para quantificação destes picos, consoante os diferentes tipos de parentesco dador/doente. No nosso estudo, não foi frequente a presença de picos *stutter*, pois foram utilizados STRs com maiores unidades de repetição e por norma o aparecimento destes picos é menos comum nestes STRs. As condições de PCR foram otimizadas, permitindo a amplificação do ADN, de todos os pares dador/doente.

O gene da amelogenina, tem sido utilizado como marcador genético em pares dador/doente de sexos diferentes. Ghaffari *et al* (50) descreveu no seu estudo, que a análise dos marcadores genéticos, STRs e gene da amelogenina, são ambas técnicas informativas. Contudo, alguns investigadores defendem que a análise do gene da amelogenina apenas pode ser realizada em simultâneo com a amplificação de STRs. Estes investigadores reportam, como possível, mutações do gene da amelogenina no cromossoma Y, resultando numa falha de amplificação do alelo Y. Do mesmo modo, existem também as mutações do gene da amelogenina no cromossoma X, permitindo, no entanto, a identificação do genótipo masculino, pela amplificação do alelo Y. Estas mutações não são muito frequentes, pois apresentam uma taxa de erro muito baixa, o que possibilita a sua utilização neste tipo de avaliação de quimerismo nos doentes pós transplante (60-62).

Avaliação de quimerismo: Comparação dos resultados dos STRs e do gene da amelogenina

Neste estudo, em 24 doentes foi analisado o seu estado de quimerismo, por amplificação de STRs, tendo em 14 doentes sido avaliado em simultâneo o gene da amelogenina. Como referido nos resultados, 20 doentes apresentaram sempre QC (83,3%) nas MNC e nos GRAN, no período pós transplante. Destes doentes, 12 foram avaliados por amplificação de STRs e análise do gene da amelogenina e os resultados foram idênticos. Dos doentes em estudo apenas 4 apresentaram QM (16,7%). Dois destes doentes evoluíram para QC, um manteve o estado de QM ao longo das avaliações e um apenas foi avaliado uma vez. Estas taxas de QC (83,3%) e QM (16,7%) são idênticas aos resultados apresentados por El-Cheikh *et al* (24).

Conclusão

Verificamos boas condições técnicas para a amplificação dos STRs e do gene da amelogenina, que permitiu sempre diferenciar as células do doente e do dador. Foi possível comprovar que são técnicas que funcionam de forma individual ou complementar, na análise de quimerismo dos doentes alotransplantados.

Neste estudo, devido ao grupo reduzido de doentes com patologias distintas, estes não foram divididos por tipo de condicionamento utilizado e tipo de dador (aparentado/não aparentado). Por este motivo, não foi feita qualquer correlação entre as condições clínicas dos doentes e o estado de quimerismo no período pós transplante.

PERSPETIVAS FUTURAS

1.TRANSPLANTAÇÃO HEMATOPOIÉTICA NO SÉCULO XXI

Em todo o mundo, mais de 60.000 doentes recebem transplante hematopoiético, por ano, sendo um número exponencial e tendo já chegado a um milhão de transplantes, no ano de 2012 (67). Os estudos e pesquisas cooperativas, realizados nos diversos centros oncológicos especializados promovem a evolução do potencial curativo da transplantação hematopoiética. O empenho e a colaboração entre os investigadores e todos os profissionais de saúde impulsionam o desenvolvimento de novas estratégias clínicas. Certamente que, num futuro próximo, o número de transplantes hematopoiéticos realizados anualmente irá aumentar. Por isso, nos nossos dias, vários grupos de trabalho, nomeadamente o projeto *Eurochimerism*, concentram esforços na pesquisa e recolha de dados, através do acompanhamento dos doentes e de conferências científicas e educacionais, que desenvolvem diretrizes para novas terapias (9, 42, 67, 69).

Com a disponibilidade de novos protocolos clínicos, surge a necessidade de abordagens laboratoriais mais sensíveis, reforçando a ideia da utilização de novos métodos para a análise de quimerismo. Uma das técnicas que é considerada promissora, é a técnica de PCR em tempo real, por amplificação de polimorfismos de ADN. Em contraste com a convencional técnica de PCR, permite a quantificação de um número de moléculas alvo, através da medição contínua da luz de fluorescência produzida por reações específicas, durante o processo de PCR, permitindo uma quantificação mais precisa dos ácidos nucleicos (57).

2.NOVAS PERSPETIVAS DE TRABALHO NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA

As técnicas de monitorização de quimerismo nos doentes alotransplantados usadas neste estudo passaram a ser realizadas como rotina, no Serviço de Hematologia Laboratorial do IPO do Porto. Para além da separação das células mononucleares e granulócitos, passou a realizar-se, recentemente, a separação das populações de linfócitos, T e B do sangue. A avaliação de quimerismo nas diferentes populações permite traçar diferentes práticas clínicas, consoante o diagnóstico de cada doente.

No Serviço de Transplante de Medula Óssea, os doentes são avaliados continuamente e em curtos intervalos de tempo, permitindo a deteção de alterações hematopoiéticas.

Atualmente, uma medida laboratorial em fase de implementação é a utilização de um teste de STRs *multiplex*. Estes *kits* comerciais contêm *primers* marcados com fluorescência, específicos para diversos STRs, o que permite a determinação dos STRs mais informativos. Os sistemas *multiplex* são mais informativos, pois analisam um grande número de STRs, em simultâneo. Deixa de ser necessária a realização de 1º e 2º teste de identificação do STR informativo.

O *software* destes *kits multiplex* analisa automaticamente os STRs que permitem distinguir as células do dador e do doente, estabelecendo um perfil de transplante. Nos seguimentos dos doentes, é possível realizar uma análise quantitativa do quimerismo. Aumentando o poder de discriminação e a diminuição do tempo da análise, bem como as quantidades de ADN, estes *kits* tornam-se economicamente mais rentáveis.

Estes testes estão a ser testados no Serviço de Hematologia Laboratorial e os seus resultados são considerados promissores.

BIBLIOGRAFIA

1. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. The New England journal of medicine. 2007;357(15):1472-5.

2. Gratwohl A, Baldomero H. Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. Current opinion in hematology. 2009;16(6):420-6.

3. Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. Journal of cellular and molecular medicine. 2005;9(1):37-50.

4. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. The New England journal of medicine. 2006;354(17):1813-26.

5. Hsieh MM, Wu CJ, Tisdale JF. In mixed hematopoietic chimerism, the donor red cells win. Haematologica. 2011;96(1):13-5.

6. Park M, Seo JJ. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Bone marrow research. 2012;2012:680841.

7. Park M, Koh KN, Seo JJ, Im HJ. Clinical implications of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. The Korean journal of hematology. 2011;46(4):258-64.

8. Spitzer TR. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism. The oncologist. 2000;5(3):215-23.

9. Svenberg P, Mattsson J, Ringden O, Uzunel M. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism. Bone marrow transplantation. 2009;44(11):757-63.

10. Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. Bone marrow transplantation. 1997;19(2):161-72.

11. Krishna KA. Bone Marrow Transplantation. The open biotechnology journal. 2009;3(1).

12. Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martin C, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. 2001;86(1):24-9.

13. Chotinantakul K, Leeanansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. Bone marrow research. 2012;2012:270425.

14. Korbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? Blood. 2001;98(10):2900-8.

15. Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. Current opinion in hematology. 2008;15(4):285-92.

16. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socie G, Esperou H, Devergie A, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. Blood. 2002;99(8):2726-33.

17. D'Arena G, Musto P, Di Mauro L, Cascavilla N, Iacono ND, Scalzulli PR, et al. Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies. American journal of hematology. 1998;58(4):255-62.

18. Goncalo AP, Barbosa IL, Campilho F, Campos A, Mendes C. Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. Transplantation proceedings. 2011;43(1):241-3.

19. Sairafi D, Remberger M, Uhlin M, Ljungman P, Ringden O, Mattsson J. Leukemia lineage-specific chimerism analysis and molecular monitoring improve outcome of donor lymphocyte infusions. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2010;16(12):1728-37.

20. Chang YJ, Huang XJ. Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation: when, if and for whom? Blood reviews. 2013;27(1):55-62.

21. Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. Bone marrow transplantation. 2005;35(3):283-90.

22. Buffart TE, Janssen JJ, Huijgens PC. Reduced-intensity conditioning regimens in malignant haematological diseases. The Netherlands journal of medicine. 2005;63(2):43-51.

23. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2009;15(12):1628-33.

24. El-Cheikh J, Vazquez A, Crocchiolo R, Furst S, Calmels B, Castagna L, et al. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. American journal of hematology. 2012;87(12):1074-8.

25. Mohamedbhai SG, Edwards N, Morris EC, Mackinnon S, Thomson KJ, Peggs KS. Predominant or complete recipient T-cell chimerism following alemtuzumab-based allogeneic transplantation is reversed by donor lymphocytes and not associated with graft failure. British journal of haematology. 2012;156(4):516-22.

26. Kim HO, Oh HJ, Lee JW, Jang PS, Chung NG, Cho B, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. Korean journal of pediatrics. 2013;56(1):26-31.

27. Goh RY, Kim SH, Han JY. Lineage-specific chimerism analysis in nucleated cells, T cells and natural killer cells after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The Korean journal of hematology. 2011;46(1):18-23.

28. Murphy KM. Chimerism analysis following hematopoietic stem cell transplantation. Methods Mol Biol. 2013;999:137-49.

29. Ruiz Ada S, Chauffaille Mde L, Alves ST, Oliveira JS. Prevalence of chimerism after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina. 2009;127(5):251-8.

30. Chen DP, Tsao KC, Wang PN, Tseng CP, Sun CF. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Chang Gung medical journal. 2002;25(11):734-42.

31. Kristt D, Israeli M, Narinski R, Or H, Yaniv I, Stein J, et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. Journal of biomolecular techniques : JBT. 2005;16(4):380-91.

32. Mossallam GI, Kamel AM, Storer B, Martin PJ. Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2009;15(3):352-9.

33. Shaw BE, Byrne JL, Das-Gupta E, Carter GI, Russell NH. The impact of chimerism patterns and predonor leukocyte infusion lymphopenia on survival following T cell-depleted reduced intensity conditioned transplants. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2007;13(5):550-9.

34. Champlin R, Khouri I, Anderlini P, De Lima M, Hosing C, McMannis J, et al. Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. Biology and current indications. Oncology. 2003;17(1):94-100; discussion 3-7.

35. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colomer D, Rovira M, Martinez C, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. Leukemia. 2003;17(3):613-20.

36. Koehl U, Beck O, Esser R, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Frankfurt experience. Leukemia. 2003;17(1):232-6.

37. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2001;7(9):473-85.

38. Issa F, Wood KJ. Translating tolerogenic therapies to the clinic - where do we stand? Frontiers in immunology. 2012;3:254.

39. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. Bone marrow transplantation. 2007;39(5):255-68.

40. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi MH, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogenic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. Leukemia. 2004;18(10):1681-6.

41. Chen DP, Tseng CP, Tsai SH, Wu TL, Chang PY, Sun CF. Systematic analysis of stutters to enhance the accuracy of chimerism testing. Annals of clinical and laboratory science. 2008;38(3):264-72.

42. Matsuda K, Yamauchi K, Tozuka M, Suzuki T, Sugano M, Hidaka E, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by short tandem repeats, and the effect of CD selection on its sensitivity. Clinical chemistry. 2004;50(12):2411-4.

43. Buno I, Nava P, Simon A, Gonzalez-Rivera M, Jimenez JL, Balsalobre P, et al. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. Haematologica. 2005;90(10):1373-9.

44. Shimoni A, Nagler A, Kaplinsky C, Reichart M, Avigdor A, Hardan I, et al. Chimerism testing and detection of minimal residual disease after allogeneic hematopoietic transplantation using the bioView (Duet) combined morphological and cytogenetical analysis. Leukemia. 2002;16(8):1413-8; discussion 9-22.

45. Diez-Martin JL, Llamas P, Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Polo N, de la Fuente MS, et al. Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leukocyte infusion (DLI). Haematologica. 1998;83(5):408-15.

46. Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice. 2004;4(3):177-87.

47. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Acta haematologica. 2004;112(1-2):16-23.

48. Mossallam GI, Smith AG, McFarland C. Comparison of variable number tandem repeat and short tandem repeat genetic markers for qualitative and quantitative chimerism analysis post allogeneic stem cell transplantation. Journal of the Egyptian National Cancer Institute. 2005;17(2):103-13.

49. Odriozola A, Riancho JA, Mijares V, Nunez-Cespedes J, Zarrabeitia MT. Chimerism detection by short tandem repeat analysis when donor and recipient genotypes are not known. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2012;413(5-6):548-51.

50. Ghaffari SH, Chahardouli B, Gavamzadeh A, Alimoghaddam K. Evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with amelogenin marker. Archives of Iranian medicine. 2008;11(1):35-41.

51. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature reviews Genetics. 2004;5(6):435-45.

52. Butler JM. Short tandem repeat analysis for human identity testing. Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]. 2004;Chapter 14:Unit 14 8.

53. Sellathamby S, Balasubramanian P, Sivalingam S, Shaji RV, Mathews V, George B, et al. Developing an algorithm of informative markers for evaluation of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. Bone marrow transplantation. 2006;37(8):751-5.

54. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. Journal of forensic sciences. 2006;51(2):253-65.

55. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing--comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. Leukemia. 2004;18(2):248-54.

56. Abu Halima MS, Bernal LP, Sharif FA. Genetic variation of 15 autosomal short tandem repeat (STR) loci in the Palestinian population of Gaza Strip. Legal medicine. 2009;11(4):203-4.

57. George R, Donald PM, Nagraj SK, Idiculla JJ, Hj Ismail R. The impact of chimerism in DNA-based forensic sex determination analysis. The Malaysian journal of medical sciences : MJMS. 2013;20(1):76-80.

58. Lin MT, Tseng LH, Beierl K, Harada S, Hafez MJ, Eshleman JR, et al. Analysis of hematopoietic stem cell transplant engraftment: use of loss or gain of microsatellite alleles to identify residual hematopoietic malignancy. Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B. 2011;20(4):194-202.

59. Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. The International journal of developmental biology. 1995;39(1):127-33.

60. Kashyap VK, Sahoo S, Sitalaximi T, Trivedi R. Deletions in the Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population. BMC medical genetics. 2006;7:37.

61. Shadrach B, Commane M, Hren C, Warshawsky I. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2004;6(4):401-5.

62. von Wurmb-Schwark N, Bosinski H, Ritz-Timme S. What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis? Journal of Forensic and Legal Medicine. 2007;14(1):27-30.

63. Graham Solomons TW, Fryhle CB. Organic Chemistry. 10th Ed ;2011.

64. Rauwerdink CA, Tsongalis GT, Hill JM, Meehan KR. Peripheral Blood Chimerism Can Replace Marrow Chimerism Analyses Following Adult Allogeneic Stem Cell Transplant. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2010;16(2):S287.

65. Kreyenberg H, Holle W, Mohrle S, Niethammer D, Bader P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. Leukemia. 2003;17(1):237-40.

66. Hill CR, Kline MC, Mulero JJ, Lagace RE, Chang CW, Hennessy LK, et al. Concordance study between the AmpFlSTR MiniFiler PCR amplification kit and conventional STR typing kits. Journal of forensic sciences. 2007;52(4):870-3.

67. Gratwohl A, Niederwieser D. History of hematopoietic stem cell transplantation: evolution and perspectives. Current problems in dermatology. 2012;43:81-90.

68. Kong SY, Ki CS, Kim HJ, Lee KO, Bae JC, Kim SH, et al. Evaluation of imprecision for analysis of short tandem repeats by use of mixed blood cells in variable concentrations. Clinical chemistry. 2004;50(11):2193-5.

69. Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia. 2012;26(8):1821-8.

70. Stout JT, Caskey CT. HPRT: gene structure, expression, and mutation. Annual review of genetics. 1985;19:127-48.

71. Pasquet L, Joffre O, Santolaria T, van Meerwijk JP. Hematopoietic chimerism and transplantation tolerance: a role for regulatory T cells. Frontiers in immunology. 2011;2:80.

72. Elkin G, Prigozhina TB, Slavin S, Gurevitch O, Khitrin S, Resnick IB. Visualization of immune response kinetics in full allogeneic chimeras. American journal of blood research. 2011;1(2):110-8.

ANEXOS

PROTOCOLOS LABORATORIAIS

IPOPORTO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO FG, EPE	SERVIÇO DE HEMATOLOGIA
	Protocolo Isolamento de populações de leucócitos

Princípio do método:

O procedimento permite o isolamento de populações de leucócitos: células mononucleares e granulócitos, a partir de sangue total.

Material e Equipamento:

- Luvas
- Centrífuga
- Pipetas e respectivas pontas
- Tubos de 14 mL com tampa
- Pipetas de Pasteur
- Seringas e respetivas agulhas

Reagentes:

- Amostra (Sangue total)
- PBS 1x
- PBS 10x
- Tetraspan 60mL/mg
- Água destilada
- Ficoll (*Lymphoprep®, Axis Shield*)

Procedimento:

NOTA: Retirar todos os reagentes do frio e colocar à temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento.

1. Colocar a amostra de sangue em tubos de 14mL e adicionar 4 mL de Tetraspan 60 mg/mL, que vai funcionar como agente de sedimentação.
2. Os tubos ficam a sedimentar durante 20 minutos, ligeiramente inclinados para acelerar o processo.
3. Retirar o sobrenadante com os leucócitos para outro tubo e colocar em novos tubos com 6 mL de Ficoll (Lymphoprep®, *Axis Shield*).
4. Centrifugar durante 20 minutos a 400 x g.
5. Retirar cuidadosamente o sobrenadante de Ficoll e desprezar, retirar as células mononucleares e colocar em novos tubos – agitar o "*pellet*".
6. No mesmo tubo do passo 5 retirar o restante sobrenadante e agitar o " *pellet*" com os granulócitos.
7. Adicionar 4,5 mL de água e esperar pela hemólise dos glóbulos rubros, adicionar 0,5 mL PBS 10x e homogeneizar.
8. Adicionar no tubo que contém as células mononucleares, PBS 1x até perfazer o tubo e homogeneizar.
9. Centrifugar todos os tubos por 10 minutos a 400 x g.
10. Retirar o sobrenadante, ressuspender as células e congelar as amostras a - 20ºC até à extração de ADN.

IPOPORTO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO FG, EPE	SERVIÇO DE HEMATOLOGIA
	Protocolo Extracção e Quantificação de ADN

Princípio do método:

O *QIAamp* ADN micro *kit* é usado para purificação de ADN genómico e mitocondrial de pequenas amostras, volumes ou tamanhos. O *kit* combina selectivas propriedades de ligação de uma membrana de base sílica com volumes de eluição flexíveis entre 20 e 100 µL. O procedimento foi concebido para garantir que de amostra para amostra não há contaminação e permite um manusear seguro em amostras potencialmente infecciosas. Após a extração, é necessário determinar a concentração de ADN, o procedimento utiliza aparelhos como o NanoDrop 1000.

Material, equipamento e reagentes:

Quantidade do *Kit*	**50 preparações (cat# 56304)**	**Não fornecidos pelo fabricante**
Buffer ATL	50 mL	Etanol (96-100%)
Buffer AL*	33 mL	Água destilada
Buffer AW1 (concentrado)	19 mL	Eppendorfs
Buffer AW2 (concentrado)**	13 mL	Pipetas e respectivas pontas
Buffer AE	12 mL	Luvas descartáveis
Proteinase K	1,25 mL	Microcentrífuga
Colunas	50	Placa de aquecimento
Tubos (2mL)	200	

*Contém um sal de guanidina. Não é compatível com desinfetantes que contém lixívia.

**Contém azida de sódio como conservante.

O princípio do método de Extração de ADN consiste em quatro passos:

- Lise

As amostras são lisadas em condições de alta desnaturação a elevadas temperaturas na presença da proteinase K e *Buffer* ATL.

- Ligação

Para permitir uma ligação de ADN para a membrana, o *Buffer* AL é adicionado á amostra lisada. O conteúdo lisado é transferido para as colunas do *QIAamp Min Elute*, onde o ADN é absorvido para a membrana de sílica gel. As condições salinas e de pH asseguram que as proteínas e outros contaminantes, não são retidas na membrana da coluna.

- Lavagem

Enquanto os ácidos nucleicos permanecem ligados á coluna os contaminantes são lavados, inicialmente com *Buffer* AW1 e depois com *Buffer* AW2.

- Eluição

O ADN é eluido a partir das colunas, usando um pequeno volume de *Buffer* AE ou água destilada.

Armazenamento e Estabilidade dos Reagentes

As colunas do *kit QIAamp MinELute*, devem ser armazenadas a 2 - 8°C. Todos os reagentes, podem ser armazenados à temperatura ambiente (15-25°C), durante o período máximo de um ano, sem qualquer redução no seu desempenho. Para um armazenamento de longa duração ou temperatura ambiente superior a 25°C, a proteinase K deve ser armazenada a 2 - 8°C.

Preparação dos reagentes:

- Preparação do *Buffer* AW1:

Adicionar 25 mL de etanol (96-100%) para o frasco que contém 19 mL de *buffer* AW1 concentrado.

- Preparação *Buffer* AW2:

Adicionar 30 mL de etanol (96-100%) para o frasco que contém 13 mL de *Buffer* AW2 concentrado.

Procedimento:

Protocolo realizado a partir de 1-100 µL de amostras de sangue tratadas com EDTA, citrato ou anticoagulantes de base heparina.

Nota: No início do procedimento, ligar a placa de aquecimento a 56ºC

1. Pipetar 1-100 µL de sangue para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
2. Adicionar *Buffer* ATL para finalizar um volume de 100 µL.
3. Adicionar 10 µL de proteinase K.
4. Adicionar 100 µL de *Buffer* AL e agitar com o auxílio de um vortéx por 15 segundos.
5. Incubar a 56ºC por 10 minutos.
6. Centrifugar brevemente o tubo de 1,5 mL para remover gotas do interior da tampa.
7. Adicionar 50 µL de etanol (96-100%), agitar no vortéx por 15 segundos e incubar por 3 minutos á temperatura ambiente.
8. Centrifugar brevemente o tubo de 1,5 mL para remover as possíveis gotas que se encontram dentro da tampa.
9. Transportar com cuidado o lisado do passo 8 da coluna do *QIAamp MinELute* sem molhar a banda. Centrifugar a 6000 x g por 1 minuto. Colocar a coluna num tubo limpo de 2 mL e descartar o outro tubo.

10. Cuidadosamente abrir a coluna e adicionar 500 µL de *Buffer* AW1 sem molhar a banda. Centrifugar a 6000 x g por 1 minuto. Colocar a coluna num tubo limpo de 2 mL e descartar o outro tubo.
11. Cuidadosamente abrir a coluna e adicionar 500 µL de *Buffer* AW2 sem molhar a banda. Centrifugar a 6000 x g por 1 minuto. Colocar a coluna num tubo limpo de 2 mL e descartar o outro tubo.
12. Centrifugar a 20000 x g por 3 minutos para secar a membrana.
13. Colocar a coluna num eppendorf de 1,5 mL e descartar o outro tubo. Adicionar entre 20 - 100 µL de *Buffer* AE ou água destilada para o centro da membrana.
14. Incubar á temperatura ambiente (15 - 25ºC) por 1 minuto. Centrifugar a 20000 x g por 1 minuto.

PROTOCOLO QUANTIFICAÇÃO DE ADN:

Material, equipamento e reagentes:

- Água destilada
- Pipetas e respetivas pontas
- Luvas descartáveis
- Aparelho NanoDrop 1000

Procedimento:

1. Pipetar 2-3 µL de água desionizada para limpar ambas as superfícies ópticas.
2. Seleccionar no *software* de aplicação, o aplicativo de ácido nucleico.
3. Realizar uma medição em branco dispensando 1 µL água, para a superfície inferior ótica.
4. Adicionar 1 µL de amostra para o pedestal inferior e seleccionar "*Measure*".
5. O *software* calcula automaticamente as taxas de ácido nucleico, a sua concentração e a pureza.
6. Para finalizar, adicionar 2 µL de água para limpar ambas as superfícies óticas.

NOTA: Caso a concentração das amostras de ADN sejam superiores a 50 ng/µL, estas devem ser diluídas com água bidestilada. Para evitar que ao realizar a electroforese capilar, o sinal não ultrapasse o limiar máximo de detecção do *software* e surjam picos de sinal muito intenso (*offscale*).

IPOPORTO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO FG, EPE	SERVIÇO DE HEMATOLOGIA
	Protocolo PCR e Electroforese em gel de agarose

Princípio do método:

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite replicação *in vitro* do ADN. Quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a sua deteção rápida e fiável dos marcadores genéticos. A electroforese em gel de agarose é a técnica padrão para separar, identificar, analisar e caracterizar fragmentos de ADN.

Material e equipamento:

- Câmara de Biossegurança
- Luvas
- Centrífuga
- Micropipetas e respectivas pontas com filtro (20 a 200 µl, 1 a 10 µl e 0.2 a 2 µl)
- Termociclador programável (*Applied Biosystems* 2720)

Reagentes:

- Água bidestilada
- $MgCl_2$
- dNTPs
- *DNA* Polimerase (*AmpliTaq Gold* da *Applied*)
- *Primers Forward* e *Reverse*

Armazenamento e estabilidade dos reagentes:

Todos os componentes da reacção são estáveis à temperatura de -20ºC. Antes de iniciar a reacção de PCR, todos os reagentes devem ser descongelados à temperatura ambiente (18 – 25ºC), exceptuando a *Taq* Polimerase que deverá ser retirada do frio somente no momento exacto da sua utilização, de forma a ser evitada a perda de actividade e especificidade.

Os *primers* da reacção são igualmente muito instáveis e facilmente perdem a sua especificidade. Desta forma, o acto de descongelação/congelação deverá ser efectuado o menor número de vezes possível.

Diluição de *Primers*:

Quando necessário diluir *primers*, este procedimento deve ser realizado pelo menos 30 minutos antes de começar a preparar a Mistura da reacção (*Mix*), é realizado segundo as fórmulas apresentadas.

1. A diluição de cada *primer* é feita num *eppendorf* safe-lock ou num tubo de 2mL de tampa de rosca que poderão ser colocados no interior da câmara quando a luz UV estiver ligada, para assegurar a total esterilidade dos mesmos.
2. De acordo com o fabricante, geralmente adiciona-se 100 µL de água a cada tubo original de *primer*. Calcular o volume de *primer* necessário para uma concentração final de 10 nmol/L.
3. A cada um dos eppendorfs vazios adicionar a quantidade necessária de água e do respectivo *primer* (de acordo com as fórmulas apresentadas) e ressuspender. Após 30 minutos os *primers* estão prontos para serem usados
4. Congelar os *primers* até à próxima utilização.

Nota: Geralmente o volume final são 1000 µL. Porém, quando é necessário fazer mais do que uma diluição, é natural que já não haja quantidade suficiente para preparar uma alíquota de 1000µL sendo que os cálculos deverão ser ajustados para a quantidade de *primer* existente.

- ***Primers***

n = 10,0 nmol (Tubo original)
V = 100 µl

$$[\ ] = \frac{10\ nmol}{100\ \mu l} = \frac{10\times10^{-3}\ \mu mol}{100\times10^{-5}\ L}$$

$$= \frac{10\times10^{-3}}{10\times10^{-4}}\ \mu M$$

$$= 100\ \mu M$$

Valor protocolado dos primers

$$Ci \times Vi = Cf \times Vf$$

$$100 \times Vi = 10 \times 100\ \mu l$$

$$Vi = 10\ \mu l\ primer + 90\ H_2O$$

- **Amelogenina**

Forward

n = 22,0 nmol (Tubo Original)
V = 100 µl

$$[\ ] = \frac{22{,}0\ nmol}{100\ \mu l} = 220\ \mu M$$

$$220 \times Vi = 10\ nM \times 100$$

$$Vi = \frac{100}{220} = 4{,}55\ \mu l$$

$$4{,}55\ \mu l\ Primer + 95{,}45\ \mu l\ H_2O$$

Reverse

n = 23,4 nmol (Tubo Original)
V = 100 µl

$$[\ ] = \frac{23{,}4\ nmol}{100\ \mu l} = 234\ \mu M$$

$$234 \times Vi = 10\ nM \times 100$$

$$Vi = \frac{100}{234} = 4{,}27\ \mu l$$

$$4{,}27\ \mu l\ Primer + 95{,}73\ \mu l\ H_2O$$

***Primers* e respetivas sequências:**

Primer	Localização Cromossómica	Sequência dos *Primers*
VWA	12p13.31	5'-CCCTAGTGGATAAGAATAATC-3' 5-'GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'
THO	11p15.5	5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'
F131	6p24-p25	5’-GAGGTTGCACTCCAGCTTT-3’ 5’-ATGCCATGCAGATTAGAAA-3’
FES	15q25-qter	5’-GGGATTTCCCTATGGATTGG-3’ 5’-GCGAAAGAATGAGACTACAT-3’
D11S	11q24.1-25	5’-GGTAGCAGAGCAAGACTGTC-3’ 5’-CACCTTCATCCCTAAGGCAGC-3’
FGA	4q31.3	5'GCCCCATAGGTTTTGAACTCA-3' 5'-TGATTTGTCTGTAATTGCCAGC-3'
HPRT	Xq26-27	5’-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3’ 5’-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3’
AMELOGENINA	X: p22-1-22.3 Y: p11.2	5’-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3’ 5’-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3’

Procedimento:

1. Preparar as amostras de ADN, centrifugar durante 5 segundos e manter em gelo;

2. Preparar a mix de reacção seguindo as quantidades da tabela I;

3. Distribuir 22,5 µL de *Mix* por cada poço das tiras devidamente identificadas;

4. Adicionar 2,5 µL de ADN de amostra ao poço correspondente;

5. Adicionar 2,5 µL de água bidestilada ao controlo negativo;

6. Centrifugar as tiras para eliminar possíveis bolhas nos poços

7. Colocar as tiras no termociclador e iniciar o programa descrito nas tabelas II e III.

I. *Mix* de 25 µL de volume final com 2,5µL de amostra

Condições	$C_{inicial}$	C_{final}	$V_{1\ caso}$
Taq Buffer sem $MgCl_2$	10x	1x	2.5µL
$MgCl_2$	25mM	1.5mM	1.5µL
dNTPs	10mM	0,2mM	0.5µL
Primer Forward	10µM	0,2µM	0,5µL
Primer Reverse	10µM	0,2µM	0.5µL
Taq polimerase		1U	0,1µL
Água			16.9µL

II. Condições de Amplificação dos *Primers*: VWA; THO; F131; FES; D11S; FGA; HPRT

Passo	Temperatura (ºC)	Tempo	
Ativação da Taq	95ºC	10 min	1 Ciclo
Desnaturação	94ºC	45 seg.	
Anealing	54ºC	45 seg.	35 Ciclos
Extensão	72ºC	1 min.	
Extensão final	72ºC	15 min	1 Ciclo

III. Condições de Amplificação do *Primer*: Amelogenina

Passo	Temperatura (ºC)	Tempo	
Ativação da Taq	95ºC	10 min	1 Ciclo
Desnaturação	94ºC	1min	
Anealing	60ºC	1min	35 Ciclos
Extensão	72ºC	1 min.	
Extensão final	72ºC	10 min.	1 Ciclo

NOTA: A água deve ser bidestilada de uso exclusivo para as reações de PCR. Após a sua utilização deverá ser vedada com parafilme e armazenada no frigorífico pelo período máximo de 1 mês e devidamente identificada com o nome do investigador e data.

1. Limpar com álcool a 70%, todo o material utilizado e guardá-lo no seu devido lugar, assim como a base da câmara com álcool a 70%.

2. Ligar a luz UV por 15 minutos.

ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR:

Material e equipamento:

- Tina de electroforese (Bio-RAD)
- Fonte de alimentação
- Transiluminador de UV
- Placas e respectivos pentes

Reagentes:

- Agarose (Agarose Grisp)
- TBE (1x) (*National Diagnostics* order Nº EC- 860)
- Marcador de 50 pb (Gene *Ruler* –50 pb DNA *ladder* 0,1 µg/µL, 50 µg)
- Brometo de Etídeo
- *Loadying Dye*

Procedimento:

1. Preparar a placa e escolher os pentes adequados ao número de amostras

2. Preparar um gel de agarose a 1,5%, colocar num balão 1,5 g de agarose e 100 mL de TBE (1x) (obtido por diluição com água destilada da solução "10x" que é comercializada), aquecer á temperatura média num microondas até a solução se apresentar transparente.

3. Pipetar 5 µL de brometo de etídeo e adicionar ao balão – homogeneizar. O brometo de etídeo vai intercalar na cadeia dupla de ADN e ao expor á luz UV vai emitir fluorescência permitindo a visualização das bandas no final do procedimento.

4. Verter o conteúdo do balão para a placa e colocar os pentes adequados aos números de amostras.

5. Esperar cerca de 20 minutos para o gel polimerizar.

6. Retirar os pentes e colocar a placa com o gel numa tina de electroforese com TBE.

7. Carregar cada poço do gel com 11 µL de produto de PCR misturado com 3 µL de *loading dye.*

8. Colocar num dos poços do gel, 2 µL de marcador 50 pb.

9. Ligar a tina à fonte de alimentação com uma voltagem de 120 Volts

10. Ligar a fonte de alimentação e deixar o gel "correr" durante 40 minutos

11. Retirar o gel e visualizar num transiluminador de UV, com o software de aplicação *Quantity one.*

IPOPORTO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO FG, EPE	SERVIÇO DE HEMATOLOGIA
	Protocolo Análise de fragmentos por Electroforese Capilar

Princípio do método:

A análise de fragmentos através de electroforese capilar baseia-se na determinação do tamanho de fragmentos amplificados por PCR, utilizando *primers* marcados com fluorescência, por comparação com um marcador de tamanho conhecido (*size standard*). O uso de diferentes fluorescências permite a análise de vários fragmentos ao mesmo tempo.

Material e Equipamento:

- Luvas
- Pipetas e respectivas pontas
- ABI3130 *Genetic Analyser (Applied Biosystems)*

Reagentes:

- Formamida HiDi
- GS 500 Liz

Procedimento:

1. Num eppendorff colocamos 15 µL de formamida HiDi e 0,3 µL de Liz, multiplicado pelo número de produtos de PCR.
2. Na placa colocamos os tubos consoante o número de amostras e em cada tubo colocamos 15 µL da mistura obtida no passo 1 e 0,15 µL do produto de PCR.
3. No *software GeneMapper* v3.7 (2), inserimos os nomes dos doentes, assim como os seus respetivos seguimentos e *primers* utilizados.

4. De seguida clicamos em "*run*" e é iniciado o processo de leitura da placa e posteriormente a análise dos fragmentos dos produtos de PCR.

5. O software utilizado para a análise dos resultados é o *GeneMapper* v3.7(2).