UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MARCELA DAMBROWSKI DOS SANTOS

Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de quimerismo hematopoiético

Ribeirão Preto
2018

MARCELA DAMBROWSKI DOS SANTOS

Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de quimerismo hematopoiético

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração:
Genética

Orientador:
Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Santos, Marcela Dambrowski dos
Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de quimerismo hematopoiético. Ribeirão Preto, 2018.
104 f. : il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.
Orientador: Simões, Aguinaldo Luiz.

1. InDel. 2. Quantificação. 3. qPCR. 4.TMO. 5. TCTH.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Marcela Dambrowski dos

Título: Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de quimerismo hematopoiético

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Genética.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Ao meu pai, **Geferson**,

que sonhou em ter uma filha Doutora.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Profº. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, por esses sete anos de inúmeras discussões, críticas, sugestões e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Drª. Belinda Pinto Simões, responsável pelo Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, por ceder as amostras de doadores e pacientes transplantados de medula óssea, sem as quais esse trabalho não seria viável.

À Profª. Drª. Zilá Luz Paulino Simões, por ceder seu laboratório e reagentes, cuja colaboração foi essencial para realização dos ensaios experimental desta pesquisa.

Ao Emerson de Souza Santos, pela disponibilidade e auxílio técnico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP-USP, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado, em especial a secretária Susie Adriana Penha Nalon, pelo apoio e amizade construída.

Ao Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/Proex) pela concessão da bolsa de doutorado e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao meu chefe e colegas funcionários do Setor de Controle de Leitos e Internação do HCFMRP-USP, pela empatia e compreensão nos meses que precederam a entrega da Tese.

Aos colegas do Laboratório: Alice Norberto de Carvalho, Ana Lúcia Pimentel, Cláudia Emília Vieira Wiezel, Edna Maria Pereira, Fernanda Bueno Barbosa, Igor Caetano Dias Alcarás, Thaís Fenz Araujo e Vanessa Escolano Maso, cujo companheirismo me fizeram um profissional mais capacitado.

À Sabrina Pereira Santos cuja amizade forjada em alegrias e tristezas fez de mim um ser humano melhor.

Agradeço especialmente à Maria do Carmo Tomitão Canas, que me ensinou a respirar nos momento difíceis, e à Aline Silva Paula Brazorotto e à Maria Luisa de

Barros Rodrigues que me ensinaram a diferença entre ser colega e ser amiga. Pela parceria e amizade, minha gratidão eterna a vocês!

À minha família, que sempre me apoiou em minhas escolhas e que torce pelo meu sucesso. Especialmente, agradeço aos meus pais por me ensinarem que o eu trago na cabeça é mais importante do que o que eu visto.

Ao Leonardo Barcelos de Paula, meu companheiro durante toda essa jornada que, nos momentos finais de redação da Tese, cuidou de tudo ao meu redor para que eu pudesse me dedicar exclusivamente à pesquisa. Essa conquista é nossa!

"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre".
Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO xi
ABSTRACT xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES xiii
LISTA DE TABELAS xv
LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS xvii

INTRODUÇÃO 21

MARCADORES INSERÇÃO/DELEÇÃO (INDEL) 21
Definição 21
Distribuição e frequência 22
InDels como marcadores genéticos 22
PRIMERS INDEL-ESPECÍFICOS 23
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS 24
Quimerismo hematopoiético 25
Quantificação de quimerismo hematopoiético 26

HIPÓTESE 30

OBJETIVOS 32

OBJETIVO GERAL 32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

MATERIAL E MÉTODOS 34

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 34
AMOSTRAS BIOLÓGICAS 34
ASPECTOS ÉTICOS 35
MARCADORES GENÉTICOS INSERÇÃO/DELEÇÃO ANALISADOS 35
ANÁLISE LABORATORIAL 38
Reação em Cadeia da Polimerase 38
Eletroforese em gel de poliacrilamida 39
Coloração e secagem de gel 41
Quantificação de *DNA*-padrão 42
Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real 43
Padronização da *InDel-qPCR* 46
Quantificação de quimerismo hematopoiético 48

RESULTADOS 51

AMOSTRAS BIOLÓGICAS 51
DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA – RECEPTORES E DOADORES 53
PADRONIZAÇÃO LABORATORIAL 54
InDel-qPCR 54
β-actina 65

QUANTIFICAÇÃO DE *DNA* RESIDUAL NAS AMOSTRAS PÓS-TMO 67
Caso 01 67
Caso 02 67
Caso 03 67
Caso 04 68
Caso 05 68
Caso 06 69
Caso 07 69
Caso 08 70
Caso 09 70
Caso 10 70
QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL E FRAÇÃO DE DNA RESIDUAL 71

DISCUSSÃO 74

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA 74
PADRONIZAÇÃO *INDEL-QPCR* 75
QUANTIFICAÇÃO DE QUIMERISMO HEMATOPOIÉTICO 76
Caso 01 76
Caso 02 77
Caso 03 77
Caso 04 78
Caso 05 78
Caso 06 78
Caso 07 79
Caso 08 79
Caso 09 80
Caso 10 80
ESPECIFICIDADE DOS *PRIMERS INDEL* 80
SENSIBILIDADE DE *PRIMERS* INSERÇÃO-ESPECÍFICOS EM *QPCR* 81
INFORMATIVIDADE DOS *LOCI* INDEL 82

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

APÊNDICES 91

ANEXO 94

MANUSCRITO 95

RESUMO

Santos MD. Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de quimerismo hematopoiético [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: Métodos quantitativos sensíveis e acurados para monitorar o quimerismo hematopoiético após Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) são necessários para verificar o sucesso do enxerto, uma vez que os resultados influenciam a abordagem terapêutica. Método: A técnica de detecção de *DNA* baseada em *primers* inserção-específicos de marcadores genéticos do tipo InDel (Inserção/Deleção) foi avaliada quanto a sua utilidade em quantificar quimerismo em amostras de DNA em baixa concentração, em PCR em Tempo Real (qPCR). Para isso, amostras de DNA de dez pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea (TMO) foram analisados para quantificar a concentração de *DNA* residual em diferentes períodos pós-transplante. Os resultados obtidos pela InDel-qPCR foram comparados com a evolução clínica descrita nos prontuários. Resultados: As quantificações do *DNA* residual variaram de 0,021 ng/µL a 11,71 ng/µL, correspondendo a fração de 0,065% a 40,6% do *DNA* total presente na amostra. Os resultados obtidos (presença ou ausência do alelo *inserção*) foram condizentes com a evolução clínica dos pacientes, em alguns casos, evidenciando quimerismo prévio ao relatado nos prontuários. Conclusão: Nossos dados demonstram a utilidade do método *InDel-qPCR,* baseada em *primers* inserção-específicos, no monitoramento de quimerismo hematopoiético.

Palavras-chave: InDel, Quantificação, qPCR, TMO, TCTH.

ABSTRACT

Santos MD. Insertion/Deletion markers for quantification of hematopoietic chimerism by [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2018.

Introduction: Sensitive and accurate quantitative methods to monitor hematopoietic chimerism after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) are necessary to evaluate engraftment since the results influence a therapeutic approach. Method: DNA detection technique based on insert-specific primers for Insertion/Deletion polymorphism (InDel) was evaluated for chimerism quantification of samples with low amounts of DNA, by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Samples of patients undergoing Bone Marrow Transplantation (BMT) collected at different post-transplantation times were analyzed to quantify the residual DNA concentration. Then, the results found using InDel-qPCR were compared to the medical records. Results: DNA quantifications ranged from 0.021 ng/µL to 11.71 ng/µL, corresponding to a fraction of 0.065% to 40.6% of the total DNA. Our results, in some cases, shows chimerism presence previously to that reported in the medical records. Conclusion: Our data demonstrate the usefulness of the InDel-qPCR method based on insertion-specific primers in the monitoring of hematopoietic chimerism.

Keywords: InDel, Quantification, qPCR, BMT, HSCT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Polimorfismos Inserção/Deleção (*InDel*) bialélicos são caracterizados pela presença ou ausência de um ou mais pares de bases. Seus alelos, por extensão, são denominados alelo *inserção* e alelo *deleção*, respectivamente. 21

Figura 2. Esquema da hematopoiese. Adaptado de Sankaran e Weiss (2015). 24

Figura 3. Esquema da posição relativa dos *primers* (em vermelho) a serem utilizados na detecção do alelo *inserção* (em azul). *Forward* e *Reverse* são *primers* flaqueadores à região *InDel*, enquanto que o *primer Forward* i é complementar à inserção. 36

Figura 4. Gráfico de amplificação gerado a partir da detecção do sinal de fluorescência (R_n) durante os sucessivos ciclos da PCR em Tempo Real. Demonstração da *baseline* do sinal fluorescente, do *threshold* (vermelho), do C_t (*threshold cycle*) e do ΔR_n. Amostra amplificada em verde e *NTC* (*No Templete Control*) em azul. 44

Figura 5. Exemplo de curva-padrão, representada pelo *threshold cycle* (C_t) em função do logaritmo da quantidade inicial de *DNA*. Os valores de *slope*, *y-intercept* e coeficiente de determinação (R^2) são usados para gerar informação sobre a performance da reação. 45

Figura 6. A curva de dissociação ou curva de *melting* (azul) gerada após a *qPCR* na presença de corante intercalante de *DNA* mostra o decaimento da fluorescência em função do aumento de temperatura, à medida que ocorre desnaturação dos fragmentos amplificados. O pico de *melting* (verde) é obtido da derivada negativa da Fluorescência (F) pela da Temperatura (T), em função da Temperatura. A linha tracejada em vermelho demarca a temperatura de *melting* (T_m) do fragmento amplificado. 46

Figura 7. Gráfico de dispersão. Amostra de *DNA* de cada caso em função do dia pós-transplante em que foi coletada. 53

Figura 8. Padronização *locus InDel* MID1386 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 56

Figura 9. Padronização *locus InDel* MID856 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 57

Figura 10. Padronização *locus InDel* MID1039 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 58

Figura 11. Padronização *locus InDel* L22 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 59

Figura 12. Padronização *locus InDel* M2 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 60

Figura 13. Padronização *locus InDel* M2 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 61

Figura 14. Padronização *locus InDel* M6 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 62

Figura 15. Padronização *locus InDel* M17 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 63

Figura 16. Padronização *locus* β-actina. A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*. 66

Figura 17. Gráfico de pico de *melting* do *locus InDel* M17 demonstrando a amplificação de dois diferentes fragmentos na amostra do receptor pós-transplante (azul claro). No detalhe, o produto de *qPCR* submetido a *PAGE*, evidenciando que a amplificação de um fragmento espúrio tanto na amostra do doador, quanto do receptor. *NTC: no template control.* 68

Figura 18. Gráfico de pico de *melting* do *locus InDel* MID1386 demonstrando a amplificação na amostra do receptor pós-transplante de um único fragmentos (amarelo) não correspondente ao alelo *inserção* (vermelho). No detalhe, o produto de *qPCR* submetido a *PAGE*, evidenciando que a amplificação de um fragmento espúrio tanto na amostra do doador, quanto do receptor. *NTC: no template control.* 69

Figura 19. Esquema da posição relativa dos *primers* (em vermelho) a serem utilizados na detecção do alelo *deleção* (em azul). *Forward* e *Reverse* são *primers* flaqueadores à região *InDel*, enquanto que o *primer Forward* d é complementar à deleção. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de marcadores *InDels* utilizados nesta pesquisa. 36

Tabela 2. Lista dos *loci InDel* analisados no presente estudo e seus respectivos *primers* para *PCR*. 37

Tabela 3. Lista de pares de *primers* e tamanho dos *amplicons* gerados após os processos de amplificação. 37

Tabela 4. Reagentes presentes no *mix* de *PCR* para amplificação de cada *locus InDel*. 39

Tabela 5. Diluição seriada de Lambda *DNA* para quantificação de *DNA* com *Kit Quantifluor™ dsDNA System*. 42

Tabela 6. Concentração inicial dos *primers* utilizados nos ensaios de *InDel-qPCR*. 47

Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes. 51

Tabela 8. Descrição das amostras de *DNA* do receptor após o Transplante de Medula Óssea, para cada um dos 10 casos. 52

Tabela 9. Lista dos fenótipos dos 10 pacientes e seus respectivos doadores. Destacados em cinza os *loci* informativos para uso de *primers* inserção-específicos. 54

Tabela 10. Valores de C_t (*threshold cycle*) médio e T_m (temperatura de *melting*) das diluições seriadas e concentração inicial de DNA utilizadas para construção das curvas-padrão dos *loci InDel*. 64

Tabela 11. Valores de C_t (*threshold cycle*) médio e T_m (temperatura de *melting*) das diluições seriadas e concentração inicial de *DNA* utilizadas para construção das curvas-padrão do *locus* β-actina. 65

Tabela 12. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 02. 67

Tabela 13. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 07. 70

Tabela 14. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 10. 71

Tabela 15. Quantificação de *DNA* total e fração do *DNA* residual das amostras pós-transplante dos casos 02, 04, 07 e 10. 72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
%	Por cento
≤	Menor ou igual a
>	Maior que
Δ	em matemática, Diferença
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
µg/µL	Micrograma/microlitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
™	do inglês, *Trade Mark*
AAS	Anemia Aplástica Severa
ABL	do inglês, A*belson murine leukemia viral oncogene homolog*
AIM	do inglês, *Ancestry Informative Markers*
BCR	Do inglês, *breakpoint cluster region*
BMT	do inglês, *Blood Marrow Transplantation*
Bu	Bussulfan
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cfDNA	do inglês, *cell free DNA*
cm	Centímetro
C_t	do inglês, *threashold cycle*
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CV	Coeficiente de variação
Cy	Ciclosfosfamida
D+	Número de dias pós-transplante
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dbSNP	do inglês, *database of SNP*
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
ddPCR	do inglês, *droplet digital PCR*
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
del	Alelo *deleção*
del/del	Fenótipo *deleção/deleção*
dF	Derivada da fluorescência, em qPCR

dGTP	Desoxiguanosina trifostato
DLI	do inglês, *Donor leukocyte infusion*
DNA	do inglês, *deoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
dT	Derivada da temperatura, em qPCR
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
E	Eficiência, em qPCR
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Fluorescência
Flu	Fludarabina
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
g	Grama
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HSCT	do inglês, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*
in	Alelo *inserção*
in/del	Fenótipo *inserção/deleção*
in/in	Fenótipo *inserção/inserção*
InDel	do inglês, *Insertion-Deletion polymorphism*
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Medula óssea

MPS	do inglês, *Massively Parallel Sequencing*
n	Número
NCBI	do inglês, *National Center for Biotechnology Information*
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
ng/µL	Nanograma/microlitro
nm	Nanômetro
NTC	do inglês, *No Template* Control
PA	Pró-análise
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Par de bases
PCR	do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
pH	Potencial hidrogeniônico
Ph1	Cromossomo Philadelphia
PM	Peso molecular
qPCR	do inglês, *real time quantitative PCR*
qsp	Quantidade suficiente para
R^2	Coeficiente de determinação
R_n	*Reporter* normalizado, em qPCR
rpm	Rotações por minuto
SNP	do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*
STR	do inglês, *Short Tandem Repeats*
T	Temperatura
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBI	do inglês, *Total Body Irradiation*
TCTH	Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
T_m	Temperatura de *melting*
TMO	Transplante de medula óssea
U/µL	Unidade/microlitro
V	Volt
VNTR	do inglês, *Variable Number Tandem Repeats*
vs.	do latim, *versus*

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

MARCADORES INSERÇÃO/DELEÇÃO (INDEL)

Definição

Marcadores genéticos do tipo Inserção/Deleção (*InDel – Insertion-Deletion polymorphism*) bialélicos são sítios polimórficos caracterizados pela presença ou ausência de um segmento de *DNA* em um ou ambos cromossomos homólogos (**Figura 1**). Considerando um *locus* bialélico, um indivíduo pode ser classificado como homozigoto para o alelo *inserção* (*in/in*), homozigoto para o alelo *deleção* (*del/del*) ou heterozigoto (*in/del*).

Figura 1. Polimorfismos Inserção/Deleção (*InDel*) bialélicos são caracterizados pela presença ou ausência de um ou mais pares de bases. Seus alelos, por extensão, são denominados alelo *inserção* e alelo *deleção*, respectivamente.

Será considerado polimórfico o *locus* que apresentar formas alélicas distintas e nenhum de seus alelos tiver frequência igual ou superior a 99%. A ampla variabilidade genética encontrada em diversos *locus* é utilizada como marcadores moleculares para distinguir indivíduos, características fenotípicas específicas e para diagnósticos moleculares.

Distribuição e frequência

O Projeto 1000 Genomas (Consortium, 2015) fornece uma descrição abrangente dessa variação genética com base na informação de 2504 indivíduos de 26 populações humanas. A estimativa foi de 88 milhões de variantes, sendo 3,6 milhões de pequenos *InDel*s, 84,7 milhões de *SNP*s (*Single Nucleotide Polymorphism*) e 60 mil variantes estruturais. Esse número total de *InDel*s é significativamente maior do que os descritos previamente: aproximadamente 1 milhão de *InDel*s, descritos em genoma de indivíduos de Yoruba (Jiang et al., 2015), 1,6 milhões, descritos em 179 indivíduos de 3 diferentes populações (Montgomery et al., 2013), e mais de 2 milhões, descritos no genoma de 79 indivíduos (Mills et al., 2011).

Polimorfismos *InDel* podem ser divididos em cinco grandes classes (Mills et al., 2006): (a) inserções/deleções de base única; (b) expansão monomérica de base única; (c) expansões múltiplas de unidades repetitivas de 2-15 pb; (d) inserção de *transposons*; e (e) *InDel*s contendo sequências randômicas, cujas bases não seguem uma ordem ou padrão.

InDels como marcadores genéticos

Algumas características definem a qualidade de sequências de *InDel*s como marcadores genéticos: (a) tem baixa taxa de mutação, apenas $1{,}5 \times 10^{-9}$ (Besenbacher et al., 2015), quando comparados a *STR*s (*Short Tandem Repeats*) cuja taxa é de $1{,}58 \times 10^{-3}$ (Shao et al., 2016); (b) são derivados de um único evento mutacional e estão espalhados em grande número pelo genoma humano, inclusive em cromossomos sexuais (Mills et al., 2006; Weber et al., 2002); (c) podem ser utilizados como marcadores de ancestralidade genômica (*AIM - Ancestry Informative Markers*) ao apresentarem diferentes frequências alélicas entre populações de regiões geográficas distintas (Romanini et al., 2015); (d) sua detecção pode ser realizada por reação em cadeia da polimerase (*PCR - Polymerase Chain Reaction*), utilizando um par de *primers* complementares às regiões flanqueadoras à inserção ou deleção, seguida de eletroforese em que os fragmentos são claramente discriminados; e (e) pequenos *InDel*s podem ser utilizados na amplificação de pequenos *amplicons*, facilitando a análise de DNA fragmentado ou degradado (Romanini et al., 2015).

A amplificação de segmentos de *DNA* utilizando *primers* flanqueadores à região de interesse detecta todas as formas alélicas presentes na amostra analisada. Assim, em caso de misturas de *DNA*, não há distinção entre os diversos perfis ou indivíduos. Esse princípio é valido tanto para classificação fenotípica de *InDel*s, como para outros marcadores genéticos, como os *STR*s e *SNP*s.

Entretanto, há situações em que é necessário a distinção de perfis de *DNA* em misturas, por exemplo, em amostras forenses de cenas de crime, amostras de sangue periférico de gestantes para diferenciar o genoma materno do genoma fetal, em casos de quimerismo hematopoiético derivado de Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH), entre outros.

PRIMERS INDEL-ESPECÍFICOS

Quando misturas de *DNA* são submetidas à *PCR* utilizando *primers* flanqueadores ao sítio polimórfico de interesse, seja ele *STR*, *SNP* ou *InDel*, ocorre competição das sequências-alvo pelos mesmos *primers* ou sondas. O genoma em maior concentração é assim preferencialmente amplificado, e o *DNA* em menor concentração ou residual tem sua detecção prejudicada.

Essa situação é bem exemplificada por Wagner et al. (2009) quando avaliou testes de paternidade não invasivos a partir de sangue periférico materno. Os autores verificaram que *loci* autossômicos era amplificados esporadicamente, devido a supressão dos sítios de pareamento dos *primers* pela presença excessiva de *DNA* materno. Somente os *loci* específicos do cromossomo Y foram amplificados com sucesso, mesmo na presença excessiva de *DNA* da mãe, em concentração 25 vezes maior que o *DNA* fetal. Desta forma, fica evidente que uma forma de contornar o problema criado pela competição das sequências em maior e menor concentração, é direcionar os *primers* para sequências-alvo presentes em um genoma e no outro não.

Os marcadores do tipo *InDel* possibilitam o desenho de *primers* específicos ao alelo *inserção* ou *deleção*. Em nosso trabalho de Mestrado (Santos, 2014) foi descrita a utilização de *primers* inserção-específicos, em *PCR* em Tempo Real (*qPCR – real time quantitative PCR*), para detecção de sequências *InDel* fetais presentes em amostras

de sangue periférico de gestantes, demostrando a viabilidade e sensibilidade da técnica de *InDel-qPCR* com *primers* específicos.

TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

O TCTH é um procedimento baseado na infusão de células-tronco hematopoiéticas (CTH) do próprio paciente (transplante autólogo) ou de doador da mesma espécie (transplante alogênico), aparentado ou não aparentado (Majhail et al., 2015). O termo TCTH é utilizado, pois as células tronco hematopoiéticas são as responsáveis pela gênese das células sanguíneas (**Figura 2**), como eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Jagannathan-Bogdan e Zon, 2013). O objetivo desse tipo de transplante é normalizar a hematopoese do paciente, substituindo suas células doentes por células sadias, oriundas do doador, no tratamento principalmente de doenças hematológicas (Hertl e Russell, 2013).

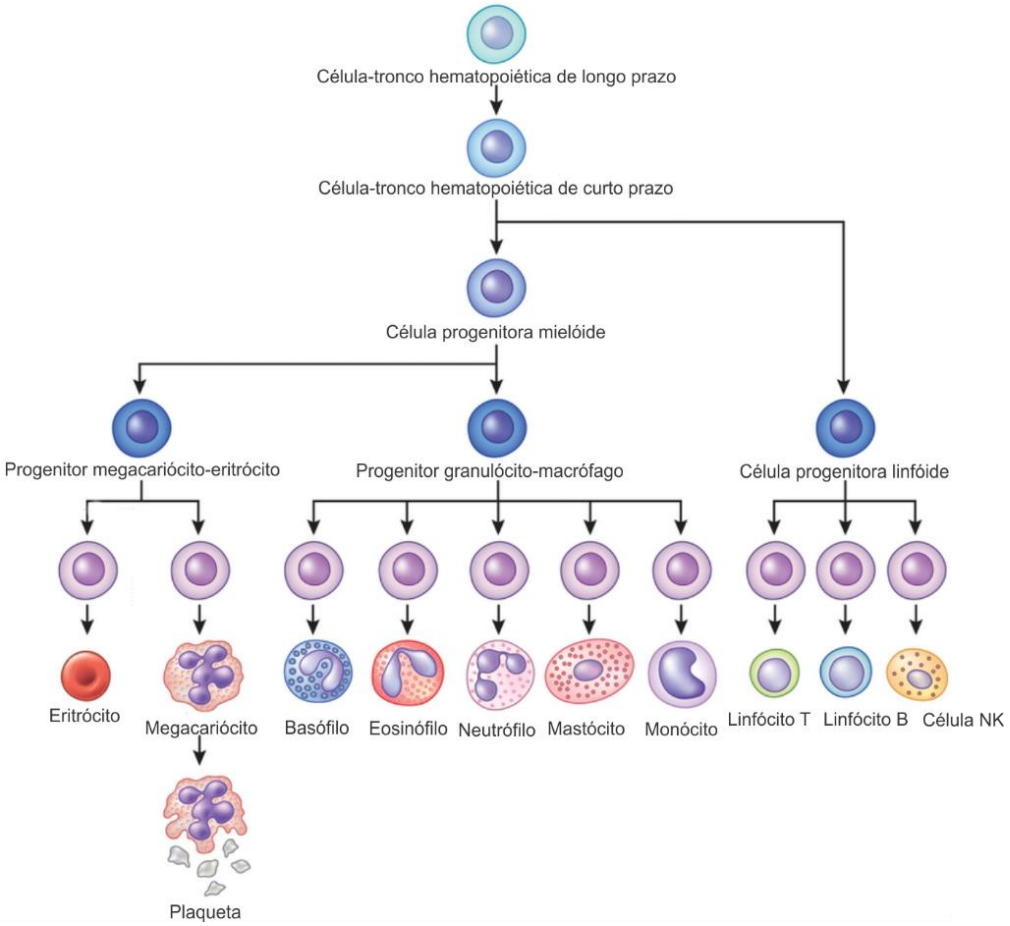

Figura 2. Esquema da hematopoiese. Adaptado de Sankaran e Weiss (2015).

São fontes de CTH: a medula óssea, o sangue periférico e sangue do cordão umbilical (AABB et al., 2016). A medula óssea (MO) é onde ocorre a hematopoiese, sendo uma rica fonte de CTH, que são coletados por múltiplas aspirações na crista ilíaca posterior de um doador alogênico ou autólogo. Para coletar CTH no sangue periférico é necessário que haja uma estimulação da MO, para que ela produza uma grande quantidade de células e as mande para a corrente sanguínea, estas células são então coletadas seletivamente por aférese. O sangue de cordão umbilical, coletado por gotejamento, é imunologicamente mais imaturo, sendo menos frequente a ocorrência da doença enxerto contra hospedeiro (DECH), principal complicação após o transplante de medula óssea (TMO).

Previamente ao TCTH, o paciente é submetido ao condicionamento, cujo objetivo é destruir a medula óssea doente e abrir espaço para a entrada da nova, além de imunossuprimir o receptor para que ele aceite a MO sem rejeitá-la. O regime de condicionamento pode ser via quimioterapia (fármacos) ou radioterapia (*TBI - Total Body Irradiation*).

Após a infusão da nova MO, o paciente está sujeito a uma série de complicações e riscos. As principais complicações que ocorrem até os 100 primeiros dias pós-TCTH (D+100) incluem: falha no enxerto e rejeição; e doença enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda. As complicações tardias (após os 100 primeiros dias) incluem: DECH crônica, que pode ocorrer por ela mesma, desenvolver a partir de DECH aguda ou aparecer após a recuperação dessa; e a recidiva da doença (AABB et al., 2016; Hertl e Russell, 2013).

Quimerismo hematopoiético

O quimerismo em humanos foi inicialmente observado após o advento da classificação dos grupos sanguíneos. Foi verificado que uma mesma pessoa apresentava mais de um grupo sanguíneo, normalmente devido ao compartilhamento do suprimento de sangue entre gêmeos não idênticos no útero materno (Bird et al., 1980; Hosoi et al., 1977).

A presença de mistura de células geneticamente diferentes em um organismo é definida como quimerismo. Usa-se o termo microquimerismo quando uma dessas linhagens celulares encontra-se em menor número, usualmente menos de 1% do total de células do corpo (Eikmans et al., 2014). O quimerismo verdadeiro se dá

pela fusão de embriões logo após a fertilização (evento pré-zigótico). Diferentemente do mosaicismo (evento pós-zigótico), que se dá pela alteração genética durante a divisão celular nos primeiros estágios embrionários e gera diferentes linhagens de células no indivíduo (Pearson, 2002).

A transferência de células entre dois organismos pode ocorrer naturalmente, tal como entre gêmeos e entre mães e filhos (Scheffer et al., 2010); ou pode ser resultado de transfusão sanguínea (Reed et al., 2007), transplantes de órgãos (Haynes et al., 2014) e de medula óssea (Willasch et al., 2014). Um paciente submetido a TCTH torna-se uma quimera permanente, uma vez que as novas células sanguíneas produzidas têm perfis de *DNA* diferente das demais células do corpo. Em caso de transfusões sanguíneas, esse estado é transitório, pois as células do doador serão eliminadas e repostas por células sanguíneas do próprio paciente.

No caso de transplantados de MO, em que é possível observar mistura de *DNA* na corrente sanguínea (quimerismo misto), decorrente da mistura de duas diferentes populações celulares, a concentração do *DNA* do receptor é menor e considerada residual. A presença ascendente, com aumento progressivo no número de células oriundas do receptor está associada a um maior risco de recidiva da doença de base (Horky et al., 2011; Preuner et al., 2016).

Consequentemente, testes quantitativos sensíveis e acurados para monitorar o quimerismo hematopoiético são necessários para verificar o sucesso do transplante (enxerto). Isso porque, os resultados de tais testes influenciam a abordagem terapêutica, como infusões de linfócitos do doador (*DLI – donor leukocyte infusion*), quimioterapia adicional ou retransplante (Jiang et al., 2014).

Quantificação de quimerismo hematopoiético

Diferentes métodos para detecção de quimerismo hematopoiético pós-transplante já foram descritos, incluindo citogenética, análises de isoenzimas e fenotipagem de grupos sanguíneos (Bryant e Martin, 2003). Estes métodos são raramente utilizados atualmente devido a capacidade limitada de detecção de polimorfismos e a baixa sensibilidade (Lawler et al., 1987; McCann e Lawler, 1993; Tippett, 1983).

Melhor aplicabilidade clínica foi obtida pela diferenciação de cromossomos sexuais utilizando *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*), que permite avalição rápida e

quantitativa do enxerto, com sensibilidade de 1-5% (Buño et al., 2005; Fuehrer et al., 2005). Entretanto, este método está restrito a aproximadamente 50% dos pacientes transplantados.

Os ensaios mais informativos são baseados em marcadores moleculares do tipo *STR* ou microssatélites, uma subclasse dos marcadores *VNTR*s (*Variable Number Tandem Repeats*). Devido à alta informatividade e à viabilidade de aplicação, a análise de *STR*s é a ferramenta padrão de diagnóstico molecular para a quantificação de quimerismo pós-TCTH. A sensibilidade desse teste varia entre 1-5% do genótipo menos frequente quando analisadas amostras de MO ou sangue não-fracionados (Kristt et al., 2005; Odriozola et al., 2013), enquanto fracionamento celular ou procedimentos de enriquecimento de células podem aumentar a sensibilidade em mais do que 100 vezes (Thiede, 2004). A baixa sensibilidade da técnica pode estar relacionada a competição entre *primers* e os *loci* analisados.

Ensaios baseados em *qPCR* tem resultado em medidas acuradas, sensíveis e rápidas para monitoramento do quimerismo pós-TCTH. Alizadeh et al. (2002) utilizando tecnologia *TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA)* demonstrou a discriminação de mais de 90% dos pares doador/receptor, incluindo indivíduos do mesmo sexo, com sensibilidade de 0,1%.

Outros estudos propõem a análise de *SNP*, que permite a detecção do quimerismo com sensibilidade entre 0,1 e 0,5% e com especificidade de 100% em ensaios baseados em *SNP-qPCR* (Chen et al., 2010). Enquanto o método de *MPS* (*Massively Parallel Sequencing*) permite analisar simultaneamente um grande número marcadores genéticos e se mostrou útil na detecção de alelos de menor contribuição em uma mistura altamente desbalanceada de *DNA*, utilizando um painel de 1204 *SNPs* e *InDels* (Hwa et al., 2018).

Alternativamente, é utilizada *qPCR* baseada em polimorfismos Inserção/Deleção curtos que, por possuir maior sensibilidade, permite a detecção precoce de quimerismo hematopoiético, quando comparados a *STR-PCRs* (Bach et al., 2015). Um conjunto de *loci InDels* pode apresentar resultados similares aos de *STRs*, contudo, a análise de *InDels* fornece informação adicional em alguns casos com componente quimérico muito baixo ou quando a presença de bandas espúrias complica a estimativa do quimerismo (Santurtún et al., 2014). Entretanto, essas

abordagens não são amplamente utilizadas, provavelmente devido à novidade do método e à disponibilidade ainda restrita de ensaios comerciais de *InDel-qPCR*.

A análise de um único polimorfismo *InDel* por *ddPCR* (*droplet digital PCR*) mostrou que a estimativa de porcentagem de quimerismo é similar àquelas calculadas pela amplificação de 15 *STRs* (R^2 = 0,97) e amplificação de 38 InDels (R^2 = 0,975). Entretanto, foi sensível o suficiente para detectar *DNA* residual em concentração de 0,5 % na amostra (Santurtún et al., 2017).

Desta forma, a proposta deste trabalho é verificar a utilidade da técnica de detecção de *InDels*, baseada na amplificação específica de alelos *inserção,* em *qPCR*, aplicada à análise prática de uma amostra aleatória de transplantados de medula óssea.

HIPÓTESE

HIPÓTESE

Testes quantitativos sensíveis e acurados para monitorar o quimerismo hematopoiético são necessários para verificar o sucesso do transplante (enxerto), uma vez que os resultados influenciam a abordagem terapêutica.

Em nossa dissertação de Mestrado foi demonstrado o desenvolvimento de uma técnica de detecção de *DNA* específica, sensível e qualitativa, que pode ampliar a utilidade clínica dessa medida e possibilita o desenvolvimento de novos exames.

Desta forma, este trabalho tem por hipótese que a técnica de detecção de *DNA* baseada na utilização de *primers* inserção-específicos, em *qPCR*, possibilita a quantificação de *DNA* residual em pacientes transplantados de medula óssea.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Quantificar a concentração de *DNA* residual em pacientes receptores de Transplante de Medula Óssea, em diferentes períodos pós-transplante e verificar a utilidade do método *InDel-qPCR* para o monitoramento de quimerismo hematopoiético.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Selecionar um conjunto de *loci* InDels cujos *primers* flanqueadores e inserção-específicos encontram-se disponíveis em nosso laboratório.

b. Determinar o genótipo um grupo de pacientes submetidos a TMO e seus respectivos doadores, utilizando os *primers* flanqueadores, em *PCR* convencional;

c. Identificar os *loci* informativos, ou seja, aqueles em que o doador é *del/del* e o receptor é inserção positiva;

d. Padronizar a técnica de quantificação de *DNA*, utilizando *primers* específicos para inserção em *PCR* em Tempo Real;

e. Quantificar o *DNA* residual dos receptores nas amostras coletadas pós-transplante, utilizando os *primers* inserção-específicos em *PCR* em Tempo Real.

f. Quantificar o *DNA* total nas amostras pós-transplante, utilizando *primers* do gene endógeno β-actina em *PCR* em Tempo Real, e estimar a fração de *DNA* residual do receptor.

g. Analisar os prontuários de todos os pacientes e comparar a evolução clínica com os resultados obtidos pela quantificação do quimerismo pós-transplante.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram escolhidos 11 *loci InDels*, cujos *primers* flanqueadores e inserção-específicos estão disponíveis em nosso laboratório e cuja padronização de amplificação por *PCR* convencional foi previamente realizada. Uma amostra de 10 pacientes receptores e seus respectivos doadores submetidos a Transplante de Medula Óssea teve sua classificação fenotípica determinada, utilizando os pares de *primers InDel* flanqueadores em *PCR* convencional. Assim foram identificados os *loci* informativos, ou seja, aqueles em que o doador é *del/del* e o receptor é inserção positiva. Para todos esses, foi realizada a padronização da técnica de quantificação de *DNA* por *PCR* em Tempo Real, utilizando os pares de *primers* inserção-específicos/flanqueador. Posteriormente, as amostras coletadas nos diferentes períodos pós-transplante, que apresentaram *locus InDel* informativo, foram submetidas à quantificação do *DNA* residual e do *DNA* total. Por fim, os resultados obtidos foram comparados com à evolução clínica do paciente, descrita em seus prontuários.

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de *DNA* de 10 pacientes submetidos a TMO alogênico e seus respectivos doadores. Essas amostras cedidas pela Profª. Drª. Belinda Pinto Simões, do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), encontram-se estocadas em nosso laboratório em *freezer* em temperatura de -20°C, formando o biorrepositório "Doadores e receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas".

Os critérios de inclusão para seleção das amostras foram: a) Paciente submetido a Transplante de Medula Óssea (TMO); b) Doador Alogênico; c) Apresentar pelo menos uma coleta de sangue pós-transplante.

Todas as amostras de *DNA*, pré e pós-TMO foram previamente extraídas para realização de exames laboratoriais de rotina médica do Laboratório de Hematologia, sob responsabilidade da Profª. Drª. Belinda Pinto Simões. Foram utilizados três métodos de extração de *DNA*: Protocolo Fenol/Clorofórmio, *QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA)* e *Super Quick Gene DNA Extraction Kit (Analytical Genetic Testing Center, Denver, CO, USA).*

Foram recebidos 50 µL de *DNA* de cada amostra do doador e do receptor coletadas pré-TMO, e amostras do receptor pós-TMO. Foi criado um sistema de identificação de cada amostra a fim de manter a confidencialidade dos dados dos pacientes. A descrição das amostras e dados clínicas estão descritos no item **Apêndices**.

Foi verificada a concentração de *DNA* de cada amostra recebida utilizando o instrumento *NanoDrop ND1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific, 2008). O limiar de detecção do equipamento é de 2 a 3700 ng/µL. Valores da razão A260/280 indicam a pureza do DNA, sendo que o ideal é ser maior ou igual a 1,8.

ASPECTOS ÉTICOS

As amostras de sangue dos indivíduos foram coletadas para procedimentos de rotina médica, no Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, no período de maio de 1995 a novembro de 2015, pelos funcionários da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMRP-USP, por punção venosa e armazenadas em tubos *Vacutainer* com anticoagulante EDTA. Todos os procedimentos de coleta de amostras obedeceram rigorosamente às recomendações de Ética Médica.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP, sob o número 13800/2016 (**Anexo**) e CAAE 61030016.2.0000.5440.

MARCADORES GENÉTICOS INSERÇÃO/DELEÇÃO ANALISADOS

O conjunto de 11 marcadores *InDels* que foram empregados neste trabalho (**Tabela 1**) foram previamente estudados em projetos anteriores de nosso laboratório: "*Marcadores inserção/deleção na identificação humana pré-natal não invasiva*" de autoria de Santos (2014), "*Validação de marcadores inserção/deleção para*

genotipagem fetal não invasiva" de Ng (2015), "*Quantificação de DNA fetal por marcadores Inserção/Deleção no plasma de parturientes*" de Brazorotto (2017) e "*Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos InDel e detecção alelo específica*" de autoria de Rodrigues (2018), todos sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões.

Tabela 1. Lista de marcadores *InDels* utilizados nesta pesquisa.

Locus	***dbSNP***	**Cr**	**Tamanho da inserção**	**Sequência da inserção (5'-3')**	**P*i***
MID1386	ss3255433	1	21 pb	AAACTATTCATTTTTCACCCT	0,746
MID818	rs1610902	16	24 pb	GTCTGGGGAGCTGTTCTCTACCCC	0,620
MID856	rs1610941	5	26 pb	GAATCTTCTAATCACAACGAAGAAGA	0,291
MID1039	rs151001596	5	40 pb	ATGGTTCATTGTGCTGTGCCTGTGACCCTTGCAAGGTGGT	0,574
L8	rs1305049	8	29 pb	TCCCTCTTTCCTAGAACTCTGCCCTAAAA	0,665
L19	rs148112183	19	26 pb	CCCAGCGTCTCCCTGTCCGCACTGAT	0,528
L22	rs67519581	22	32 pb	GCGTGGCCTGATAACAGGGTAAGAGTCCAGAG	0,494
M2	rs111797680	2	24 pb	GTCTTAGAGAACAGAAGAGGCAGG	0,500
M6	rs66501513	6	30 pb	CACTCCAGTCTGGCAACAGAGACTCTGTCT	0,606
M12	rs143237331	12	30 pb	CAAGTGACCCTCCCCCAGTCTATTCCAATG	0,787
M17	rs72083748	17	26 pb	GCTTGTATTGCACATCACACATACCC	0,572

dbSNP: banco de dados de SNP do *NCBI;* Cr: cromossomo; P*i*: frequência do alelo *inserção*.

Em casos de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco-Hematopoiéticas, quando o doador é homozigoto *del/del* e o receptor é inserção positiva, homo ou heterozigoto (*in/_*), cria-se a situação em que, naquele *locus* específico, há uma sequência exclusiva de *DNA* do receptor que pode ser amplificada por *primer* complementar a ela (*primer* inserção-específico). Nesse sistema, o segundo *primer* a ser utilizado em conjunto com o inserção-específico pode ser complementar à sequência flanqueadora à inserção (**Figura 3**).

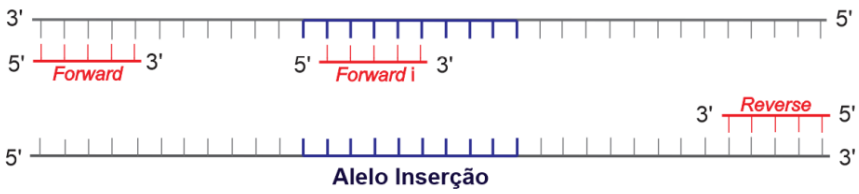

Figura 3. Esquema da posição relativa dos *primers* (em vermelho) a serem utilizados na detecção do alelo *inserção* (em azul). *Forward* e *Reverse* são *primers* flaqueadores à região *InDel*, enquanto que o *primer Forward* i é complementar à inserção.

Todos os *primers* foram desenhados com base em sequências já descritas e disponíveis no *site* do *National Center for Biotechnology Information – NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). A sequência dos *primers* (sintetizados por *Sigma-Aldrich*) e o tamanho dos *amplicons* gerados estão listados nas **Tabela 2** e **Tabela 3**, respectivamente.

Tabela 2. Lista dos *loci InDel* analisados no presente estudo e seus respectivos *primers* para *PCR*.

Locus	***Forward* (5'-3')**	***Reverse* (5'-3')**	**Inserção-específico (5'-3')**
MID1386	AGAGGATCATGGAGACCAAC	ATGTTCCAAGTCAGCAGCAC	F*i* - AACTATTCATTTTTCACCCT
MID818	TAGAGCCAGTTAGAGGGAGG	ACTTCAGTCGTCACTCCATC	R*i* - GTAGAGAACAGCTCCCCAGA
MID856	AACATGGGAACTGCTCATTA	TATTGTGCTCATTTTCTGGG	R*i* - TTCGTTGTGATTAGAAGATTC
MID1039	TGGCGTTTCATCTCTTTGG	CACAGGCTTGCAAATCTCTG	F*i* - GTTCATTGTGCTGTGCCTGT
L8	TTTAGACCAAGGCTCAAGG	CTGGAGCACATTCTGAACC	F*i* - CTTTCCTAGAACTCTGCCCT
L19	CCTCTCTGCTGTGTGGACTT	CTGGACCTCACTCTCCTCAC	F*i* - TCTCCCTGTCCGCACTGAT
L22	GTGAGTGAGGGGACAGTCGT	TGCAGGCCTGACATAGACC	F*i* - TGGCCTGATAACAGGGTAAGA
M2	AGGATTGACTCTTCTGATCAG	ATCACTGTTGTTAGGACGCA	F*i* - TTAGAGAACAGAAGAGGCAGG
M6	GAATGGCTTGAACCTGGGA	AGGACTGCGTAGTTTTGAGC	F*i* - ACTCCAGTCTGGCAACAGAGA
M12	GGTATCCCATCTTCAAAAGG	CATAACCATGGGATCCACTAGT	F*i* - CTCCCCCAGTCTATTCCAA
M17	CCATTTCTCAGTGTTGCTTG	CCATCGAAGCATCAGGAGA	F*i* - ATTGCACATCACACATACCC

F: *Forward*; R: *Reverse;* A letra *i* denota *primers* dirigidos à inserção.

Tabela 3. Lista de pares de *primers* e tamanho dos *amplicons* gerados após os processos de amplificação.

Locus	**Par de *primers***	**Tamanho do *amplicons* (pb) (*In/Del*)**
MID1386	F/R F*i*/R	89 / 68 62
MID818	F/R F/R*i*	143 / 119 86
MID856	F/R F/R*i*	138 /112 104
MID1039	F/R F*i*/R	115/75 74
L8	F/R F*i*/R	188/159 137
L19	F/R F*i*/R	171/145 80
L22	F/R F*i*/R	103/71 73
M2	F/R F*i*/R	234/210 197

Locus	Par de *primers*	Tamanho do *amplicons* (pb) (*In/Del*)
M6	F/R	245/215
	F*i*/R	190
M12	F/R	130/100
	F*i*/R	79
M17	F/R	127/101
	F*i*/R	67

F: *Forward*; R: *Reverse;* A letra *i* denota *primers* dirigidos à inserção.

ANÁLISE LABORATORIAL

Reação em Cadeia da Polimerase

A fenotipagem das amostras dos pares receptor (pré-transplante) e doador foi realizada utilizando os pares de *primers* flanqueadores à região da inserção, por *PCR* convencional. As condições de amplificação de cada *locus* estão descritas na **Tabela 4**.

Reagentes e soluções

1. Tampão de reação TE 10X: 100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl (*Sigma-Aldrich*).
2. $MgCl_2$: 25 mM (*Sigma-Aldrich*).
3. *Primers InDel*: pares de *primers* em solução trabalho de 2,5 µM (*Sigma-Aldrich*).
4. Desoxiribonucleotídeos trifosfato – *dNTP* (*dATP, dCTP, dGTP* e *dTTP*): 20 mM (*Biotools-B&M Labs, SA*).
5. Taq *DNA* polimerase: 5 U/µL (*Sigma-Aldrich*).
6. Água ultrapura MilliQ (*Millipore Corporation*).

Procedimento

Nos ensaios de *PCR* convencional, realizados em um volume final de 25 µL, os reagentes _ tampão de reação, *primers*, *dNTP* e *DNA* polimerase _ são previamente misturados em um único tubo (*mix* de reagentes) para garantir a homogeneidade das reações. A quantidade de cada reagente varia dependendo do *locus* (**Tabela 4**).

Tabela 4. Reagentes presentes no *mix* de *PCR* para amplificação de cada *locus InDel*.

Locus		Tampão de reação (µL)	Cloreto de Magnésio (µL)	Par de *primers* (µL)	dNTP (µL)	DNA polimerase (µL)	Referência
MID1386		2,5	1,5	2,0	0,16	0,4	(Santos, 2014)
MID818		2,5	1,5	2,0	0,16	0,4	(Santos, 2014)
MID856		2,5	1,5	2,0	0,16	0,4	(Santos, 2014)
MID1039		2,5	1,5	2,0	0,16	0,1	(Brazorotto, 2017)
M6		2,5	0,75	0,75	0,25	0,1	(Rodrigues, 2018)
Multiplex	M2	2,5	1,5	0,75	0,25	0,1	(Rodrigues, 2018)
	L19			0,4			
	M17			1,0			
Multiplex	M6	2,5	1,5	1,0	0,25	0,1	(Rodrigues, 2018)
	L8			0,5			
	M12			2,0			

Água ultrapura é adicionada ao *mix* de reagentes qsp 22 µL. Alguns *loci* estão padronizados em reações multiplex.

Em cada microtubo de 0,2 mL (placa de 96 poços), pipetar 3 µL de *DNA* genômico e 22 µL do *mix* de reagentes. Para cada análise, adicionar ao ensaio um controle negativo contendo água ao invés de *DNA* (*NTC*). Após homogeneização, vedar a placa com filme adesivo.

As reações de amplificação do *DNA* ocorreram no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific)*. Condições ciclagem do termociclador: aquecimento inicial a 95°C por 11 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 70°C por 1 minutos, com extensão final a 70°C por 10 minutos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Reagentes e soluções

1. Solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1): 29 g de acrilamida (PM = 71,08); 1 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida (PM = 154,17); 100 mL de água destilada.
2. Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0: 186 g de EDTA (PM = 372,24); 1 L de água destilada; acertar o pH com pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH).

3. Tampão TBE 10X 0,9 M pH 8,0: 108 g de Tris (PM = 121,1); 53 g de ácido bórico (PM = 61,83); 40 mL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0; água destilada qsp 1 L.
4. Tampão TBE 1X 0,9 M pH 8,0: 100 mL de Tampão TBE 10X; 900 mL de água destilada.
5. TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) (*Sigma-Aldrich*).
6. Solução saturada de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio (PM = 270,32); 6,5 mL de água destilada.
7. Tampão de amostra *Loading Buffer*: Sacarose; Bromofenol 2,5%; Xileno cianol 2,5%; EDTA 0,5 M pH 8,0; TBE 10X; Ficol 30%.
8. Mix para gel não-desnaturante 10%: 66,66 mL de solução acrilamida/bisacrilamida; 14 mL de glicerol; 97 mL de água destilada; 20 mL de TBE 10%.
9. *Ladder* 100 pb: 5 µL de solução *ladder* 500 µg/µL; 150 µL de água destilada; 50 µL de *Loading Buffer*.

Procedimento

Polimerizar o gel em um cassete composto por duas placas de vidro (17 cm x 13 cm) separadas por espaçadores de *teflon* e presas por grampos. Para cada placa, utilizar 13 mL de *mix* de gel não-desnaturante 10% acrescidos de 20 µL de TEMED e 500 µL de persulfato de potássio. Estes dois últimos são os catalizadores da reação de polimerização e são adicionados imediatamente antes de verter o gel no cassete. Posicionar um pente de *teflon* na borda superior, formando poços no gel, onde posteriormente são aplicados os produtos da *PCR*.

Após a polimerização do gel (30 minutos), retirar o pente e lavar os poços com água. Montar o gel em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE 1X em ambos os polos (superior e inferior). Essa cuba, conectada a uma fonte de voltagem constante, é ajustada a 200 V e 400 mA inicial. Realizar uma pré-corrida de 15 minutos, em que a cuba com o gel é ligada à fonte antes da aplicação das amostras e submetida às condições de eletroforese. Após desligar a fonte, aplicar em cada poço no gel um *mix* de 7 µL de amostra de produto de *PCR* e 7 µL de *Loading Buffer*. A cada gel também é aplicado o *ladder* de 100 pb em um dos poços. Após a aplicação das amostras, religar as fontes e a eletroforese prossegue por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Coloração e secagem de gel

Reagentes e soluções

1. Solução de nitrato de prata: 100 g de nitrato de prata; 1 L de água (manter a solução ao abrigo da luz).
2. Solução fixadora: 160 mL de álcool etílico (PA); 7 mL de ácido acético glacial (PA); 833 mL de água destilada.
3. Solução reveladora: 22,5 g de NaOH (PM = 40,00); 1 L de água destilada; no momento da coloração do gel adicionar 1 mL de Formaldeído (PM = 30,05) para cada 100 mL de solução.

Procedimento

Com o término da corrida de eletroforese, retirar o gel cuidadosamente das placas de vidro e colocar em um recipiente contendo 100 mL de solução fixadora. Adicionar 3 mL de solução de nitrato de prata, agitando por 5 minutos. Após a impregnação com nitrato de prata, descartar essa solução e lavar o gel com 100 mL de água destilada morna para retirar o excesso de prata, agitando levemente e, ao final, descartar a água.

Para a revelação do gel, adicionar ao recipiente contendo o gel aproximadamente 100 mL de solução reveladora previamente aquecida e acrescida de 1 mL de formaldeído, agitando por alguns minutos até que as bandas se tornem nítidas. A solução reveladora é então desprezada e a reação de revelação é bloqueada com solução fixadora.

Após a leitura, secar todos os géis para que possam ser armazenados para caso sejam necessárias análises e confirmações posteriores. Para isso, cobrir uma placa de vidro com papel celofane molhado. Posicionar o gel sobre estes e cobrir com outra folha de papel celofane molhada, sempre com o cuidado de não deixar bolhas de ar. Após secagem à temperatura ambiente, o gel é devidamente identificado e armazenado.

Quantificação de *DNA*-padrão

Reagentes e soluções

1. *Kit Quantifluor™ dsDNA System (TM346) - Promega.*
2. Tampão TE 20X.
3. *DNA* Lambda padrão.

Procedimento

Primeiramente os componentes do *Kit Quantifluor* são descongelados em temperatura ambiente. Preparar a solução de trabalho TE 1X diluindo 20 vezes o tampão TE 20X em água livre de nucleases.

Preparar a solução de trabalho *Quantifluor TM dsDNA Dye*. Para isso, diluir 200 vezes o *Quantifluor™ dsDNA Dye* em TE 1X. Manter a solução sob abrigo da luz cobrindo o tubo com papel alumínio ou em local escuro.

Para preparar a curva-padrão, diluir o Lambda *DNA* 1:50 em TE 1X deixando a solução na concentração de 2 ng/µL. Para isso, adicione 4 µL do *DNA* Lambda padrão em 196µL de TE 1X. Rotular como tubo 1 e utilizar a solução para o preparo da curva conforme **Tabela 5**.

Tabela 5. Diluição seriada de Lambda *DNA* para quantificação de *DNA* com *Kit Quantifluor™ dsDNA System*.

Tubo	Volume de DNA	Volume de TE 1X	Concentração
1	200 µL de Lambda *DNA* (2ng/µL)	0	2000 pg/µL
2	20 µL de Lambda *DNA* (2ng/µL)	180 µL	200 pg/µL
3	20 µL do tubo 2	180 µL	20 pg/µL
4	20 µL do tubo 3	180 µL	2 pg/µL
5	0	200 µL	0

Misturar 50 µL de cada amostra da curva-padrão (tubos 1 a 5) a 50 µL do reagente *Quantifluor* em um microtubo da placa escura de 96 poços. As amostras da curva-padrão são feitas em triplicatas. Misturar 50 µL de cada amostra desconhecida a 50 µL do reagente *Quantifluor* em um microtubo da placa escura de 96 poços.

Incubar a placa por 5 minutos no escuro e em seguida realizar a leitura no fluorímetro. Ajustar os comprimentos de onda de excitação e emissão para 485 nm e 528 nm, respectivamente.

Após a leitura, utilizar os valores de fluorescência da curva-padrão para construção de um gráfico de regressão linear e a usar a equação da reta para o cálculo dos valores da concentração das amostras desconhecidas.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Ensaios de *qPCR* foram utilizados para amplificação dos *loci InDel* informativos, utilizando os *primers* inserção-específicos em conjunto com o flanqueador complementar. Posteriormente, estes foram usados na quantificação do *DNA* residual dos pacientes submetidos a TMO.

A *qPCR* foi realizada na presença de corante fluorescente verde (*reporter*) que se liga intercala ao *DNA* fita dupla e, quando excitado por um *laser*, produz um sinal fluorescente detectado pelo termociclador. Nos primeiros ciclos da PCR (3 a 15 ciclos) há detecção de sinais de fluorescência em baixo nível (*baseline*), pequenas mudanças no sinal fluorescente consideradas como *background* ou "ruído" da reação (Invitrogen, 2008). Quando a sequência alvo está presente na amostra, o produto da *PCR* se acumula e, em algum ponto, a intensidade do sinal torna-se detectável. O aumento do sinal fluorescente é diretamente proporcional ao número de *amplicons* que estão sendo gerados.

A emissão da fluorescência pode oscilar devido a flutuações causadas por alterações na concentração dos reagentes ou no volume final. Por este motivo, utiliza-se uma referência passiva, um fluoróforo que fornece uma referência interna para a qual o sinal do corante *reporter* pode ser normalizado durante a análise dos dados. O *reporter* normalizado (R_n) é a razão entre a intensidade de emissão de fluorescência do corante *reporter* e a intensidade de emissão de fluorescência do corante da referência passiva. O R_n também pode ser corrigido pela *baseline* ($\Delta R_n = R_n - baseline$), e indica a magnitude do sinal gerado pelos *amplicons* na *qPCR* (Applied Biosystems, 2006).

A mudança na fluorescência ao longo da reação é representada em um gráfico de amplificação (**Figura 4**) que mostra o acúmulo de produtos durante a *qPCR*.

Chama-se *threshold* o nível de sinal que reflete um aumento estatisticamente significativo em relação ao sinal da *baseline*. Esse limiar distingue o sinal de amplificação do sinal basal. O ciclo em que o sinal fluorescente da reação cruza o *threshold* é denominado *threshold cycle* (C_t). Esse valor pode ser utilizado para cálculos de quantificação de *DNA*, uma vez que o valor de C_t é inversamente proporcional à quantidade inicial de *DNA* alvo.

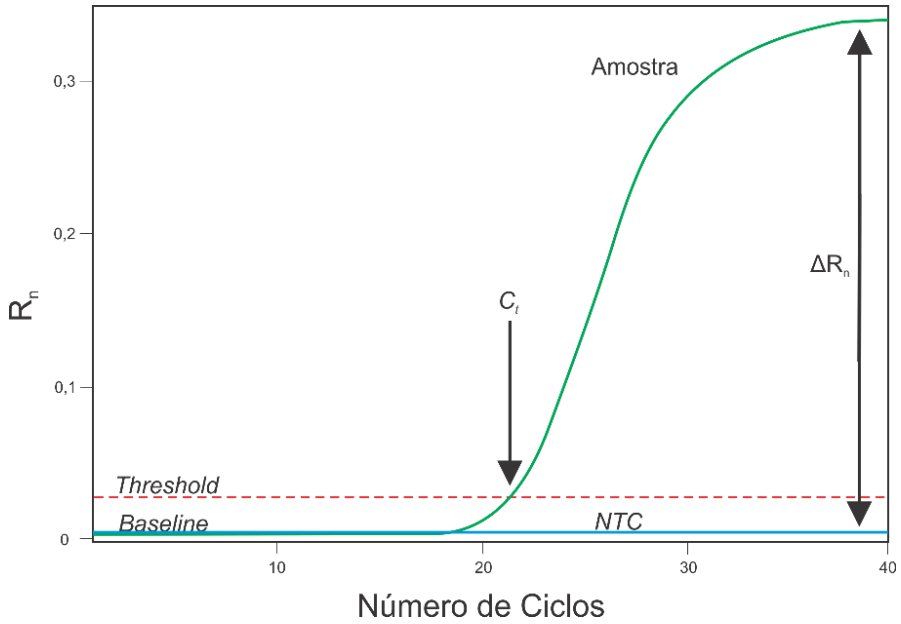

Figura 4. Gráfico de amplificação gerado a partir da detecção do sinal de fluorescência (R_n) durante os sucessivos ciclos da PCR em Tempo Real. Demonstração da *baseline* do sinal fluorescente, do *threshold* (vermelho), do C_t (*threshold cycle*) e do ΔR_n. Amostra amplificada em verde e *NTC* (*No Templete Control*) em azul.

A partir de diluições seriadas de uma amostra com concentração conhecida pode ser criada uma curva-padrão, usada para determinar a concentração inicial de uma amostra ou a eficiência da reação (**Figura 5**). A curva-padrão é dada pelo logaritmo da quantidade de *DNA* de cada amostra na diluição seriada em função do valor de C_t correspondente a cada concentração.

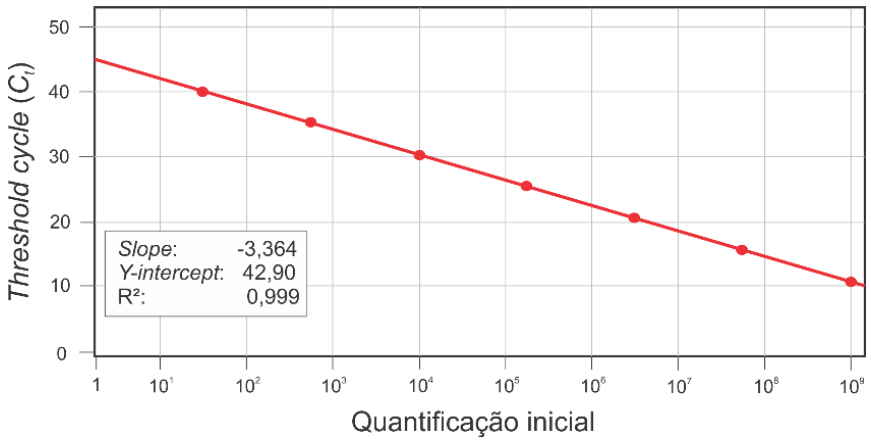

Figura 5. Exemplo de curva-padrão, representada pelo *threshold cycle* (C_t) em função do logaritmo da quantidade inicial de *DNA*. Os valores de *slope*, *y-intercept* e coeficiente de determinação (R^2) são usados para gerar informação sobre a performance da reação.

A curva-padrão deve ser linear ao longo de toda a gama de concentrações, podendo ser descrita pela equação da reta de regressão linear (y=ax+b), a qual permite calcular o número de cópias/concentração da amostra de interesse. A inclinação da curva-padrão (*slope*) é usada para avaliar a eficiência (E) da reação de *qPCR*, calculada de acordo com a seguinte equação:

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1$$

Caso optado, ao final da reação de amplificação, as amostras são aquecidas de 60ºC até 95ºC. Com o aumento da temperatura e desnaturação das duplas fitas com moléculas de corante incorporado, ocorre uma diminuição na fluorescência observada devido à liberação do corante. O decaimento da fluorescência (F), em função do aumento da temperatura (T), gera a curva de dissociação (**Figura 6**). A partir dela, é possível estimar a temperatura de *melting* (T_m) em que 50% das moléculas de DNA estão dissociadas (Stratagene, 2004).

Para melhor visualização da T_m de cada fragmento, a curva de dissociação é convertida em um gráfico de pico. O pico de *melting* (**Figura 6**) é obtido da derivada negativa da fluorescência pela temperatura, em função da temperatura (-dF/dT *vs.* T).

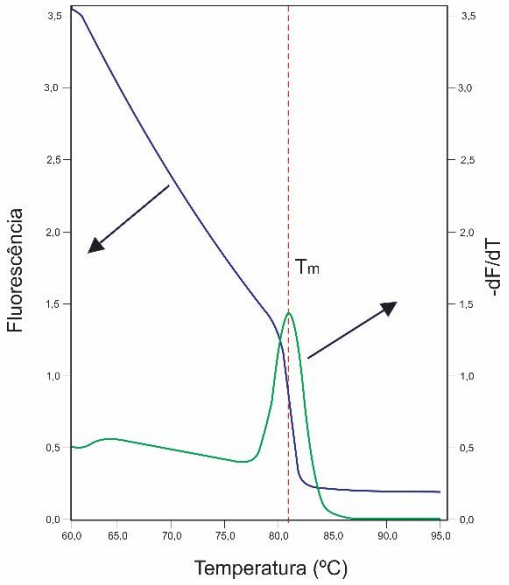

Figura 6. A curva de dissociação ou curva de *melting* (azul) gerada após a *qPCR* na presença de corante intercalante de *DNA* mostra o decaimento da fluorescência em função do aumento de temperatura, à medida que ocorre desnaturação dos fragmentos amplificados. O pico de *melting* (verde) é obtido da derivada negativa da Fluorescência (F) pela da Temperatura (T), em função da Temperatura. A linha tracejada em vermelho demarca a temperatura de *melting* (T_m) do fragmento amplificado.

Padronização da *InDel-qPCR*

Reagentes e soluções

1. *2x qPCRBIO SYGreen Mix + 50µM ROX Additive (PCR Biosystems).*
2. *Primers InDel*: pares de *primers* (*Forward-i* e *Reverse*) em solução trabalho de 1,0 µM (*Sigma-Aldrich*).
3. *Primers* β-actina: 5'-GTACTTCAGGGTGAGGATGCC-3' e 5'-CGTCTTCCCCTCCATCGTG-3': 2,5 µM (*Sigma-Aldrich*).
4. Água ultrapura MilliQ (*Millipore Corporation*).

Procedimento

Os experimentos de *qPCR* foram realizados em um volume final de 20 µL, todos os reagentes foram previamente misturados em um único tubo (*mix* de reagentes) para garantir a homogeneidade das reações. Para cada reação, foram utilizados sempre 10 µL de *SYGreen Mix + ROX,* conforme instruções do fabricante (PCRBiosystems, 2017) e 1 µL de *DNA*, além dos *primers* (**Tabela 6**), adicionando-se água ultrapura qsp 20 µL. Em cada microtubo de 0,1 mL da placa de 96 poços, foram pipetados a

amostra de *DNA* e o *mix* de reagentes. Após homogeneização, a placa foi centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e vedada com filme adesivo.

As condições de amplificação dos sete *loci* informativos utilizando os pares de *primers* inserção-específico/flanqueador (*Forward*-i/*Reverse* ou *Forward*/*Reverse*-i) foram determinadas testando diferentes concentrações de *primers*. Dessa forma é possível definir a menor concentração capaz de produzir o melhor sinal de detecção, com menor C_t e maior ΔRn, pela análise da curva de amplificação; e ausência de amplificações inespecíficas ou dímeros de *primers*, pela análise da curva de dissociação. Para isso, a quantidade inicial de *DNA* (amostra-padrão inserção positiva) foi fixada em 50 ng e variou-se a concentração inicial dos *primers* (0,5 µM; 1,0 µM; 1,5 µM; 2,0 µM; 2,5 µM e 3,0 µM). Amostras que apresentaram melhores resultados para 3,0 µM foram testadas também para as concentrações 3,5 µM e 4,0 µM.

A curva de eficiência dos pares de *primers* inserção-específicos/franqueadores foi realizada com 6 diluições seriadas (1:4) de *DNA* controle, variando de 20 a 0,019 ng de *DNA*. Em todos os ensaios de *qPCR*, as amostras foram aplicadas em triplicata. Na **Tabela 6** estão descritas as concentrações iniciais dos *primers* utilizados nos ensaios de *qPCR* após padronização.

Tabela 6. Concentração inicial dos *primers* utilizados nos ensaios de *InDel-qPCR*.

Locus	Primer Forward (µM)	Primer Reverse (µM)
MID1386	2,5	2,5
MID856	4,0	3,0
MID1039	1,0	0,8
L22	1,5	1,5
M2	3,0	3,0
M6	2,5	2,5
M17	3,5	3,5
β-actina	2,5	2,5

O gene β-actina foi utilizado como controle endógeno para quantificação do total de *DNA* presente em cada amostra pós-transplante. A eficiência da reação com os *primers* para o gene β-actina também foi verificada por meio de uma curva-padrão

com cinco diluições seriadas (1:10) de *DNA* padrão de 100 ng a 0,01 ng. A concentração inicial de cada *primer* utilizado está descrita na **Tabela 6**.

As condições de amplificação do *DNA* em termociclador *StepOnePlus™ System* (*ThermoFisher Scientific*), consistiram em: ativação inicial da polimerase a 95°C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de *melting* foi produzida ao final da reação de amplificação, aumentando a temperatura de 60°C até 95°C por 15 segundos, de acordo com instruções do fabricante.

Os resultados foram visualizados no programa *StepOne Software* versão 2.3 (*ThermoFisher Scientific*). Todos os produtos de *qPCR* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (*PAGE)* para confirmação da amplificação de fragmentos no tamanho (pb) esperado.

Quantificação de quimerismo hematopoiético

Para a quantificação do quimerismo hematopoiético foram utilizadas as amostras de *DNA* pós-transplante nos casos informativos, ou seja, quanto o doador foi classificado como homozigoto *del/del* e o receptor, heterozigoto *in/del* ou homozigoto *in/in*, em cada um dos *loci* avaliados. Dependendo da classificação do doador em homo ou heterozigoto, foram construídas duas curvas-padrão para um mesmo *locus*, devido a presença de uma ou duas cópias do alelo *inserção*.

As curvas-padrão para quantificação foram construídas com amostras de *DNA*-padrão classificados como *in/del* ou *in/in*, previamente quantificados por fluorimetria, conforme descrito anteriormente no item **Quantificação de DNA-padrão** de Materiais e Métodos.

Cada uma das amostras pós-TMO foi quantificada em triplicata, na presença da curva-padrão. Para o cálculo da quantidade inicial de *DNA* alvo presente em cada amostra pós-TMO foi utilizada a reta de regressão linear, dada pela seguinte equação:

$$y = mx + b$$

Em que,

y: C_t da amostra

m: *slope*

x: logaritmo da concentração de *DNA* da amostra

b: *y-intercept*

RESULTADOS

RESULTADOS

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para a realização deste estudo, um total de 10 casos de paciente submetidos a Transplante de Medula Óssea alogênico foram cedidas pelo Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP. Os 10 pacientes totalizaram um montante de 74 volumes de prontuários. Os dados clínicos compilados estão descritos no item **Apêndices** e, resumidamente, na **Tabela 7**.

Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes.

Total de pacientes	**10**
Sexo do paciente	
Masculino	8
Feminino	2
Sexo do doador	
Masculino	4
Feminino	6
Parentesco do doador	
Mãe	1
Irmão/Irmã	9
Diagnóstico	
Leucemia Mielóide Crônica	7
Leucemia Linfobástica Aguda	2
Anemia Aplástica Severa	1
Tipo de condicionamento*	
Mieloablativo	9
Não mieloablativo	0
Idade ao transplante, mediana (variação)	28 (13-56)
Células nucleadas infundidas ($x10^8$/Kg), mediana (variação)	4,63 (3,85-8,99)
Recidiva pós-transplante	
Precoce (≤ 1 ano)	4
Tardia (> 1 ano)	3
Sem recidiva	3

*Para um paciente não há informação no prontuário sobre o tipo de condicionamento.

Dos 10 pacientes avaliados, a maioria é do sexo masculino (80%). Já entre os doadores as mulheres foram mais frequentes (60%). Em somente um caso a doação ocorreu de mãe para filho, nos demais casos, foram entre irmãos. A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) foi a doença de base mais prevalente (70%).

Sobre o condicionamento a que os pacientes foram submetidos, para o caso 04 não foi encontrada essa informação no prontuário do paciente, os demais todos foram submetidos a condicionamento mieloablativos, ou seja, quimioterapia ou radioterapia para destruição da medula óssea previamente ao transplante.

As coletas de *DNA* pós-TMO cedidas para esta pesquisa totalizaram 72 amostras, descritas em **Apêndices**, e, de forma resumida, na **Tabela 8**. O número de coletas por caso variou de 1 a 12 amostras. A **Figura 7** apresenta a distribuição das coletas em função dos dias pós-TMO. Observa-se que somente 6 amostras (8%) foram coletadas antes do D+100 (dia pós-transplante), sendo que a maioria (82%) foram coletas após o D+365.

Tabela 8. Descrição das amostras de *DNA* do receptor após o Transplante de Medula Óssea, para cada um dos 10 casos.

Caso	Data do TMO	Amostras (*n*)	Data pós-TMO [a]	*DNA* (ng/µL) [b]
01	12/05/1995	01	26/02/1997	302,0
02	09/11/2000	05	26/01/2001 - 03/08/2005	202,3 - 469,1
03	24/01/2006	03	24/02/2006 - 25/04/2006	136,4 - 389,4
04	02/03/2001	01	26/10/2014	113,0
05	08/10/2002	12	09/01/2006 - 25/06/2012	96,8 - 821,3
06	03/12/2003	12	10/07/2006 - 20/08/2013	71,7 - 443,2
07	08/09/2004	10	13/12/2004 - 10/03/2015	5,9 - 494,4
08	20/05/2004	11	22/05/2006 - 17/11/2015	101,5 - 492,8
09	24/10/2004	07	14/02/2006 - 06/10/2006	171,3 - 403,4
10	05/09/2005	07	13/10/2005 - 31/08/2006	212,1 - 1036,4

[a] Data da primeira e da última coleta pós-transplante.
[b] Variação da concentração de *DNA* das amostras.

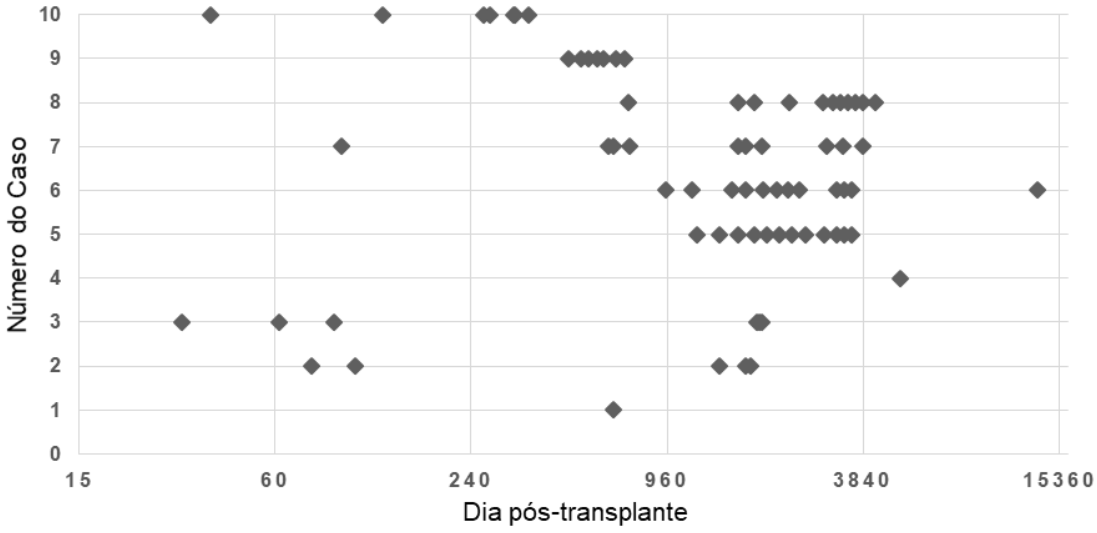

Figura 7. Gráfico de dispersão. Amostra de *DNA* de cada caso em função do dia pós-transplante em que foi coletada.

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA – RECEPTORES E DOADORES

Todas as amostras de *DNA* do receptor pré-TMO e doador tiveram seus fenótipos classificados para cada um dos 11 *loci InDel*, utilizando os pares de *primers* flanqueadores à região da inserção, por *PCR* convencional (**Tabela 9**). Assim, eles foram classificados em três possíveis fenótipos: a) homozigoto para o alelo *inserção* (*in/in*); homozigoto para o alelo *deleção* (*del/del*) e heterozigoto (*in/del*).

Foi considerado um *locus* informativo quando o doador é homozigoto para o alelo *deleção* e o receptor apresenta pelo menos um alelo *inserção*, ou seja, *in/del* ou *in/in*.

De nove casos analisados, 7 (77,7%) apresentaram *loci* informativos. Quatro casos apresentaram apenas um *locus* informativo, sendo eles os casos 02, 05, 06 e 10. Os casos 01, 04 e 07 apresentaram pelo menos dois *loci* informativos. O caso 03 foi desconsiderado uma vez que a coleta da amostra do receptor foi realizada após o primeiro TMO (**Apêndices**).

Tabela 9. Lista dos fenótipos dos 10 pacientes e seus respectivos doadores. Destacados em cinza os *loci* informativos para uso de *primers* inserção-específicos.

Amostra [a]	MID 1386	MID 818	MID 856	MID 1039	L8	L19	L22	M2	M6	M12	M17
0100	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*
0101	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*
0200	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*del/del*	*in/del*	*del/del*	*in/del*	*in/del*	*del/del*
0201	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*	*del/del*
0300	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*	*in/del*
0301	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*	*in/del*
0400	*in/del*	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/in*
0401	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*del/del*
0500	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/in*	*in/del*
0501	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*del/del*	*in/del*	*in/in*	*in/del*
0600	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*in/in*
0601	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/del*	*in/in*
0700	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*in/del*
0701	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*in/del*	*in/in*	*in/del*
0800	*in/in*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*	*in/del*
0801	*in/in*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*
0900	*in/in*	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*
0901	*in/in*	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*in/in*	*in/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*	*in/in*	*in/in*
1000	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*in/del*	*in/del*	*del/del*	*in/del*	*in/in*	*del/del*	*in/in*	*in/del*
1001	*in/del*	*del/del*	*del/del*	*in/del*	*in/in*	*del/del*	*del/del*	*in/del*	*del/del*	*in/in*	*in/in*

[a] Amostras final 00 referem-se aos receptores; Amostras final 01 referem-se aos doadores de cada caso.

PADRONIZAÇÃO LABORATORIAL

InDel-qPCR

Considerando os 11 *loci InDel* avaliados, sete foram informativos: MID1386, MID856, MID1039, L22, M2, M6 e M17. Cada *locus* poderia ser informativo em homo ou heterozigose ou em ambos os casos. Neste último caso, necessitando de padronização de duas curvas-padrão, como o ocorrido para o *locus* M2. Assim, para os sete *loci InDel*, foram padronizadas um total oito curvas-padrão para quantificação do quimerismo hematopoiético das amostras dos receptores pós-TMO.

A seguir são apresentadas imagens, para cada *locus InDel* informativo, demonstrando: a) curva de amplificação das diluições seriadas realizadas para

avaliar a eficiência dos *primers* inserção-específico/flanqueador; b) curva-padrão produzida para quantificação de *DNA*; e c) pico de *melting* gerado a partir da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Abaixo de cada imagem estão também descritos os valores de *slope*, *Y-intercept*, coeficiente de determinação e eficiência de cada curva-padrão (**Figura 8Figura 15**). Enquanto na **Tabela 10** são listados os valores de C_t médio e T_m média obtidos para cada uma das seis diluições realizadas em triplicata.

A análise da curva de dissociação mostra um único pico de *melting* correspondente à amplificação de um único fragmento em cada um dos *loci*. Não houve amplificação na ausência de *DNA* (*NTC*) ou na presença de *DNA*-padrão homozigoto *del/del*, ambos controles negativos das reações.

MID1386 – *in/in*

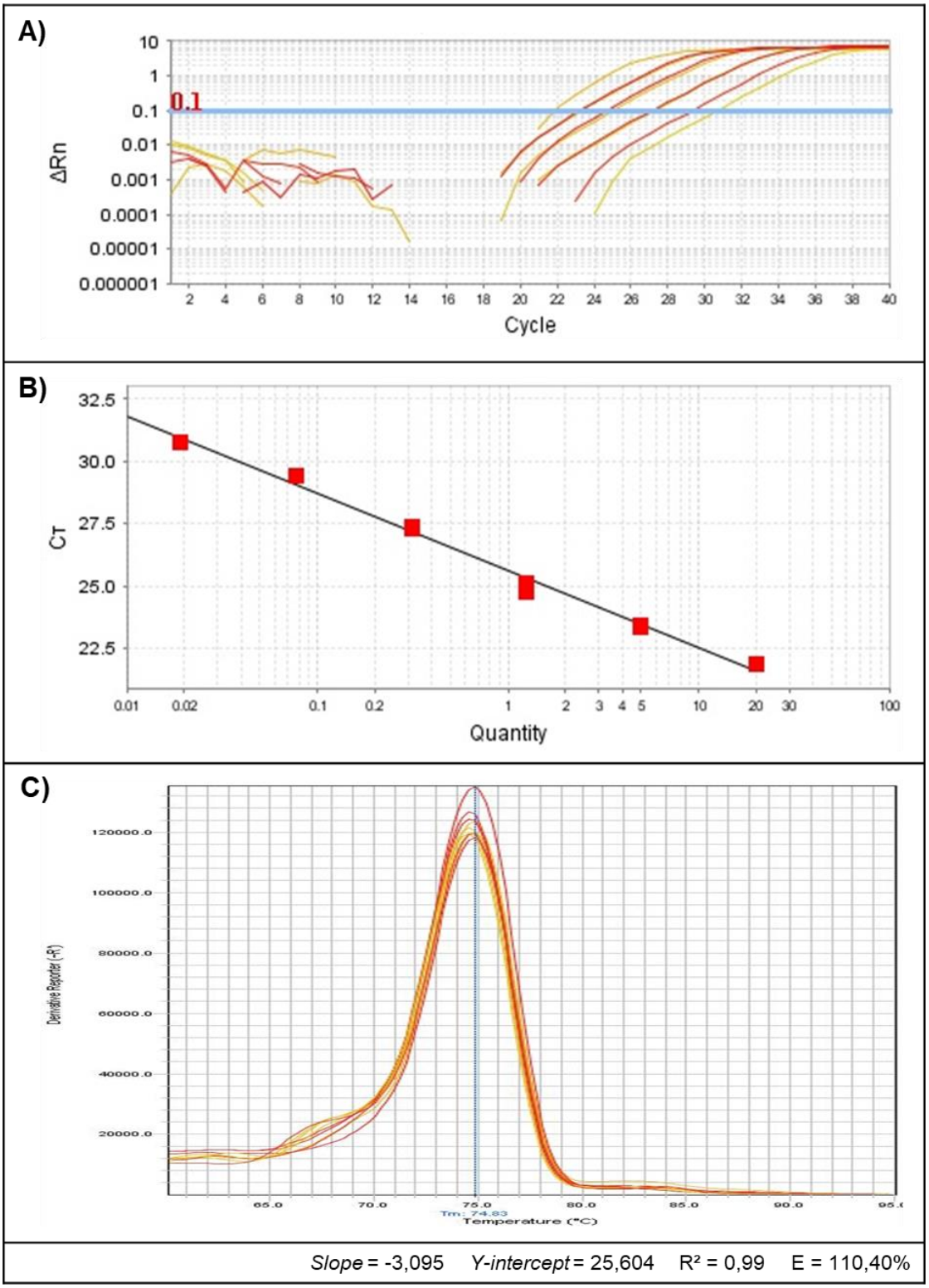

Figura 8. Padronização *locus InDel* MID1386 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

MID856 – *in/del*

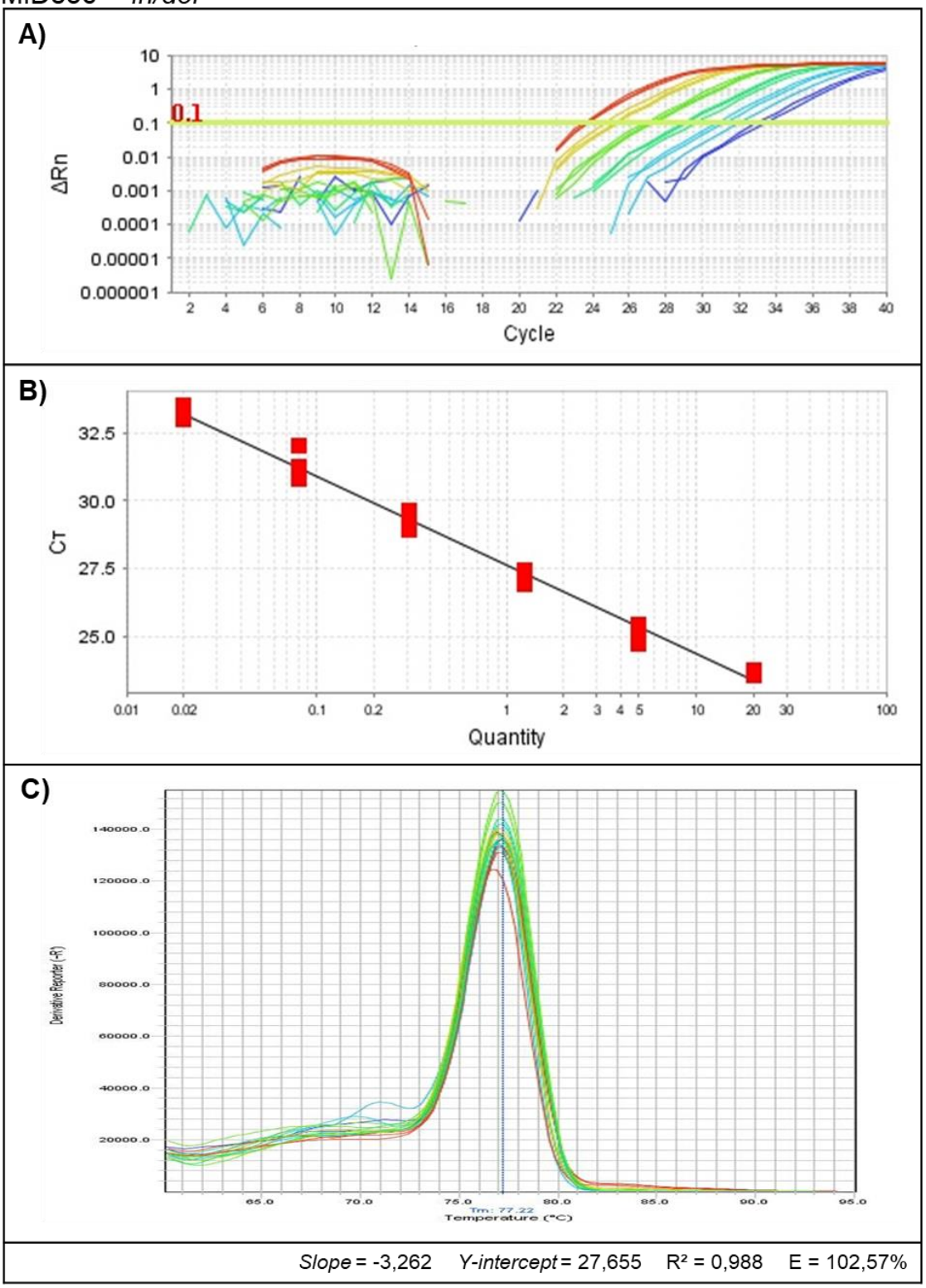

Figura 9. Padronização *locus InDel* MID856 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

MID1039 – *in/del*

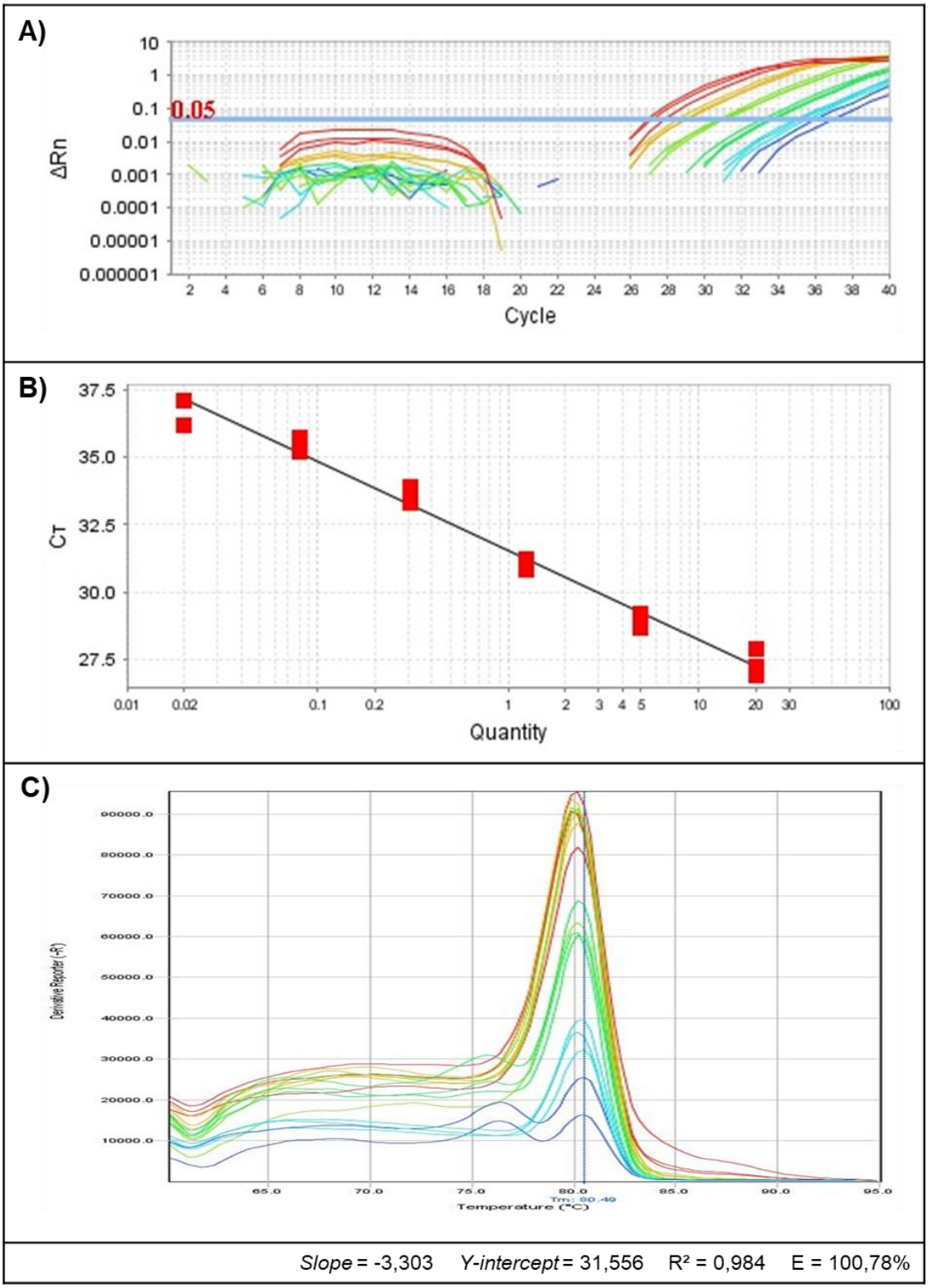

Figura 10. Padronização *locus InDel* MID1039 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

L22 – *in/del*

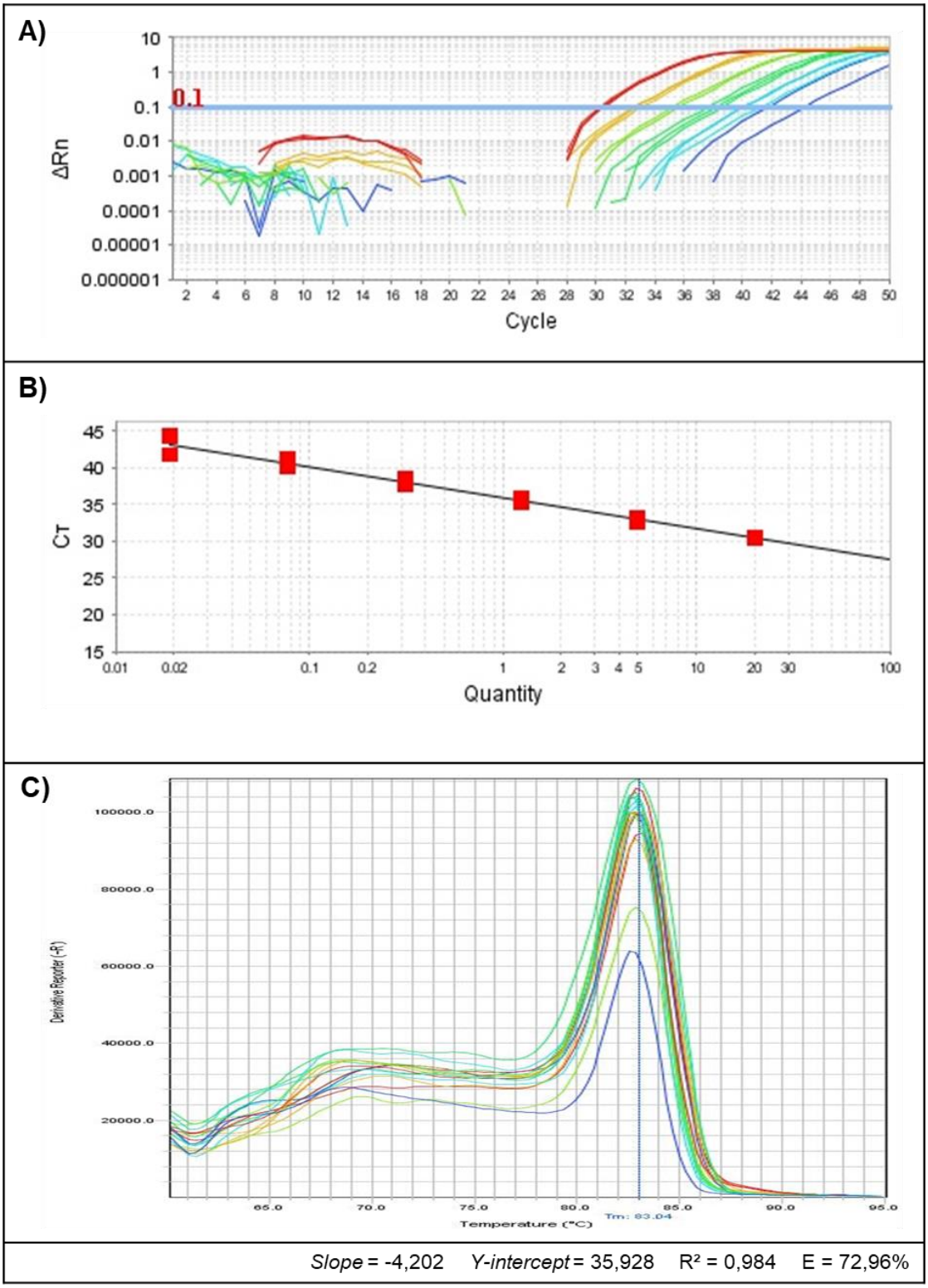

Figura 11. Padronização *locus InDel* L22 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

M2 – *in/in*

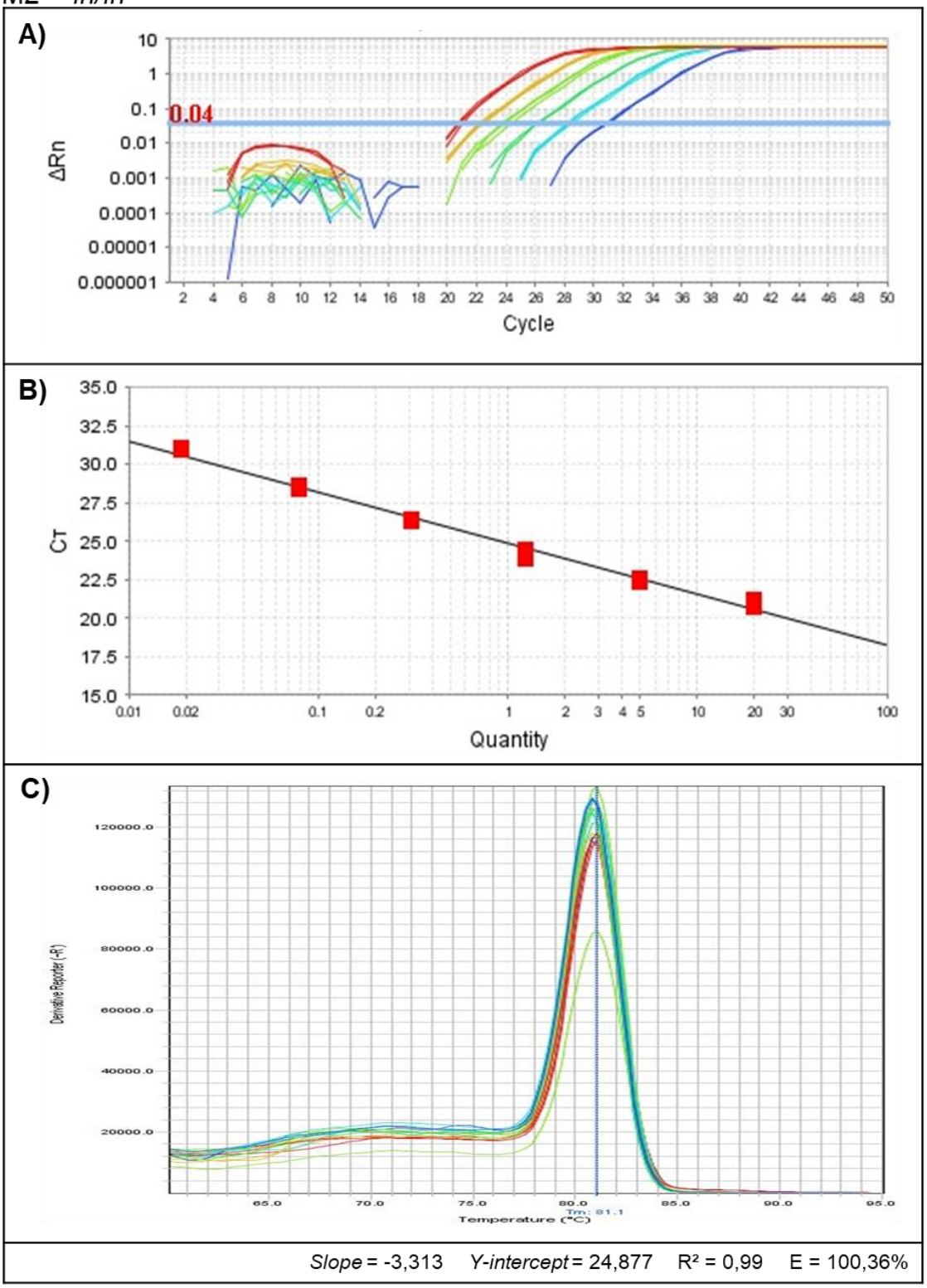

Figura 12. Padronização *locus InDel* M2 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

M2 – *in/del*

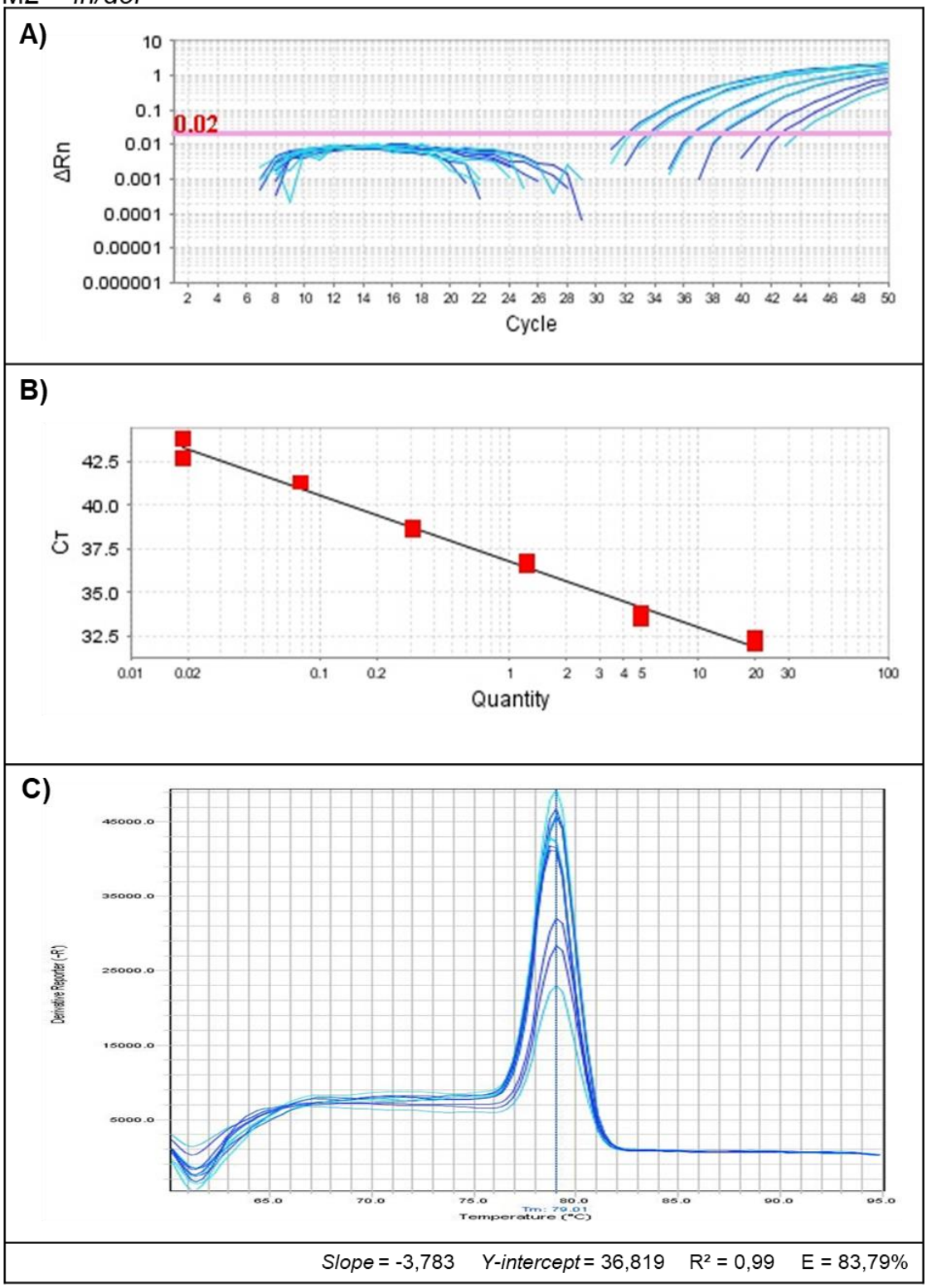

Figura 13. Padronização *locus InDel* M2 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

M6 – *in/del*

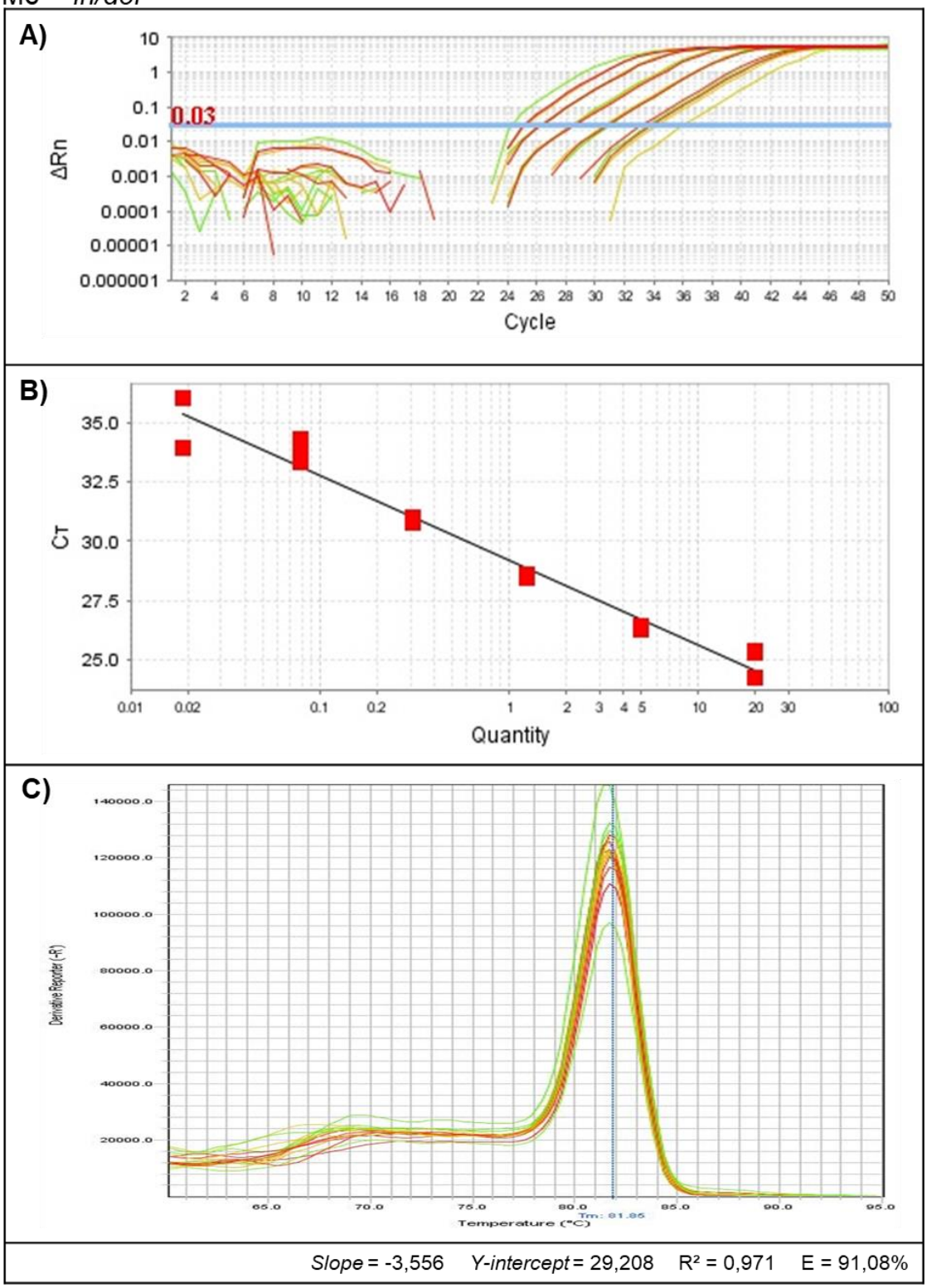

Figura 14. Padronização *locus InDel* M6 (*in/del*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

M17 – *in/in*

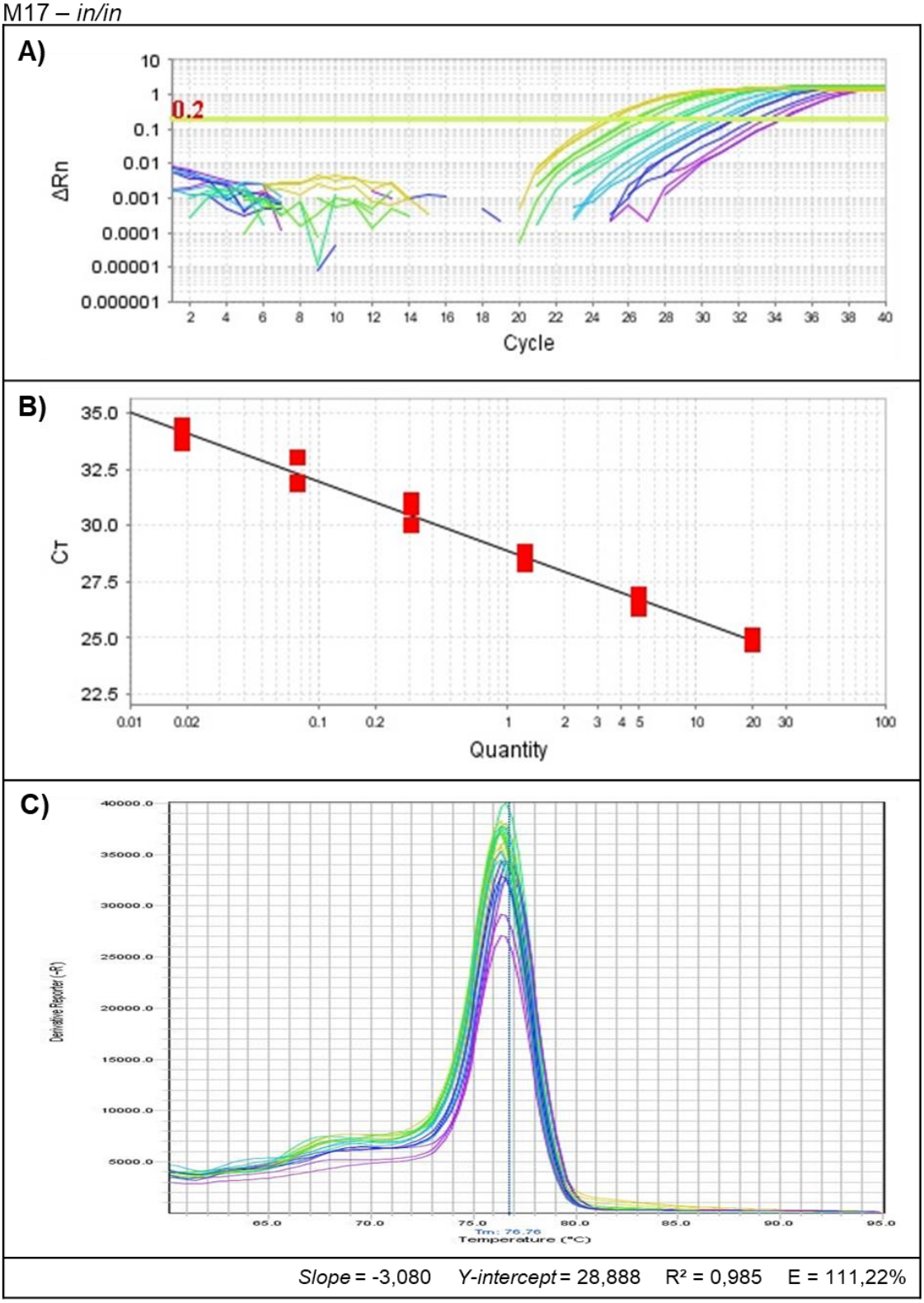

Figura 15. Padronização *locus InDel* M17 (*in/in*). A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

Tabela 10. Valores de C_t (*threshold cycle*) médio e T_m (temperatura de *melting*) das diluições seriadas e concentração inicial de DNA utilizadas para construção das curvas-padrão dos *loci InDel*.

Locus	**Diluição**	***DNA* (ng/µL)**	***C_t***		***T_m***
			Média	**DP**	
MID1386 (*in/in*)	1	20,000	21,90	0,01	74,83
	2	5,000	23,37	0,05	74,83
	3	1,250	24,95	0,27	74,68
	4	0,312	27,33	0,04	74,53
	5	0,078	29,44	0,01	74,68
	6	0,019	30,73	0,01	73,94
MID856 (*in/del*)	1	20,000	23,68	0,11	77,07
	2	5,000	25,13	0,37	77,07
	3	1,250	27,21	0,27	77,07
	4	0,312	29,26	0,36	77,07
	5	0,078	31,35	0,61	77,07
	6	0,019	33,25	0,37	77,22
MID1039 (*in/del*)	1	20,000	27,35	0,49	80,20
	2	5,000	28,99	0,29	80,20
	3	1,250	31,08	0,21	80,20
	4	0,312	33,64	0,29	80,35
	5	0,078	35,44	0,28	80,35
	6	0,019	36,67	0,65	80,49
L22 (*in/del*)	1	20,000	30,46	0,12	82,74
	2	5,000	32,91	0,25	82,89
	3	1,250	35,56	0,28	82,89
	4	0,312	38,20	0,49	82,74
	5	0,078	40,57	0,63	82,89
	6	0,019	43,06	1,79	82,74
M2 (*in/in*)	1	20,000	20,94	0,21	80,80
	2	5,000	22,51	0,11	80,80
	3	1,250	24,11	0,30	80,95
	4	0,312	26,36	0,09	80,95
	5	0,078	28,47	0,12	80,95
	6	0,019	31,05	0,10	80,95
M2 (*in/del*)	1	20,00	32,20	0,24	79,00
	2	5,00	33,62	0,21	79,00
	3	1,25	36,66	0,13	78,86
	4	0,31	38,67	0,04	78,86
	5	0,078	41,34	0,01	79,01
	6	0,019	43,26	0,80	79,01
M6 (*in/del*)	1	20,000	24,99	0,60	81,69
	2	5,000	27,07	1,19	81,84
	3	1,250	27,82	1,30	81,55
	4	0,312	30,87	0,11	81,55
	5	0,078	33,79	0,48	81,85

Locus	Diluição	*DNA* (ng/µL)	C_t		T_m
			Média	DP	
	6	0,019	34,97	1,48	81,85
M17 (*in/in*)	1	20,000	24,93	0,20	76,47
	2	5,000	26,56	0,35	76,47
	3	1,250	28,61	0,31	76,47
	4	0,312	30,64	0,59	76,62
	5	0,078	34,13	0,43	76,76
	6	0,019	32,26	0,68	76,76

DP: Desvio padrão

β-actina

A eficiência da reação de amplificação utilizando os *primers Forward* e *Reverse* do gene β-actina também foi avaliada mediante diluições seriadas em fator de diluição 1:10, com concentração inicial de *DNA* variando de 100 ng a 0,01 ng.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** estão descritos os valores de C_t médio correspondentes a cada diluição e temperatura de *melting* (T_m) dos fragmentos amplificados. Não houve amplificação na ausência de *DNA* (*NTC*). Na **Figura 16** estão representadas: a) curva de amplificação das diluições seriadas realizadas para avaliar a eficiência dos *primers*; b) curva-padrão produzida para quantificação de *DNA* total das amostras; e c) pico de *melting* gerado a partir da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Também estão descritos os valores de *slope*, *Y-intercept*, coeficiente de determinação e eficiência de cada curva-padrão.

Tabela 11. Valores de C_t (*threshold cycle*) médio e T_m (temperatura de *melting*) das diluições seriadas e concentração inicial de *DNA* utilizadas para construção das curvas-padrão do *locus* β-actina.

Locus	Diluição	*DNA* (ng/µL)	*Ct*		T_m
			Média	DP	
β-actina	1	100,00	21,31	0,07	86,69
	2	10,00	25,77	0,07	86,69
	3	1,00	29,32	0,15	86,49
	4	0,10	32,87	0,19	86,59
	5	0,01	35,97	0,20	86,36

DP: Desvio padrão

β-actina

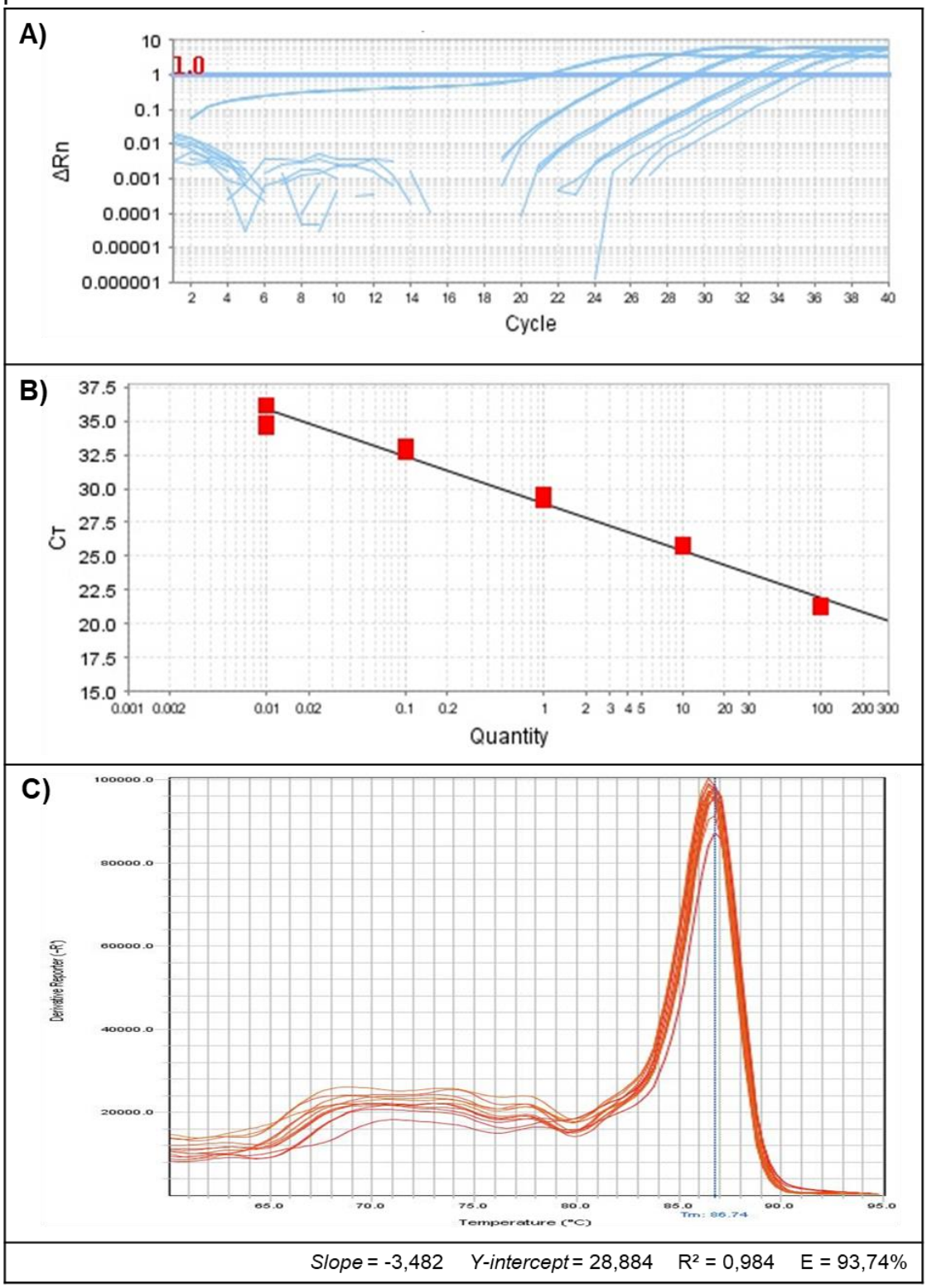

Figura 16. Padronização *locus* β-actina. A) Curva de amplificação. B) Curva-padrão. C) Pico de *melting*.

QUANTIFICAÇÃO DE *DNA* RESIDUAL NAS AMOSTRAS PÓS-TMO

Os resultados das quantificações de *DNA* residual utilizando a técnica de *InDel-qPCR* e *primer* inserção específico estão apresentados a seguir para cada caso. No geral as quantificações variaram de 0,021 ng/µL a 11,71 ng/µL, com média de 2,616 ng/µL e mediana de 0,437 ng/µL.

Caso 01

O Caso 01 apresentou cinco *loci InDel* informativos: MID856, MID1039, L22, M2 e M6. Os resultados da *InDel-qPCR* mostraram ausência do alelo *inserção* na única amostra de *DNA* do receptor pós-transplante disponível para análise.

Caso 02

O Caso 02 apresentou apenas o *locus InDel* L22 como informativo. Na **Tabela 12** estão os resultados obtidos após a quantificação por *InDel-qPCR* das cinco amostras de *DNA* colhidas pós-TMO.

Tabela 12. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 02.

Amostra	L22		
	***DNA* (ng/µL)**	**DP**	**CV (%)**
0202	5,787	0,26	4,55
0203	1,266	0,06	4,47
0204	0,437	0,12	26,61
0205	2,273	0,15	6,77
0206	7,145	0,15	2,10

DP: Desvio padrão;
CV: Coeficiente de variação.

Caso 03

O caso 03 não foi avaliado por *InDel-qPCR* por não apresentar *loci* informativos.

Caso 04

O Caso 04 apresentou os *loci* M2 e M17 como informativos. Os resultados da *InDel-qPCR* mostraram presença do alelo *inserção* na única amostra de *DNA* do receptor pós-transplante disponível para análise.

Utilizando o *locus* M2 foi possível estimar a concentração de *DNA* residual em 0,125 (± 0,03) ng/µL com CV = 26,81%.

No entanto, com o *locus* M17 não foi possível realizar a quantificação, uma vez que houve amplificação do alelo *inserção* e de um fragmento outro de *DNA* presente também no genoma do doador (**Figura 17**).

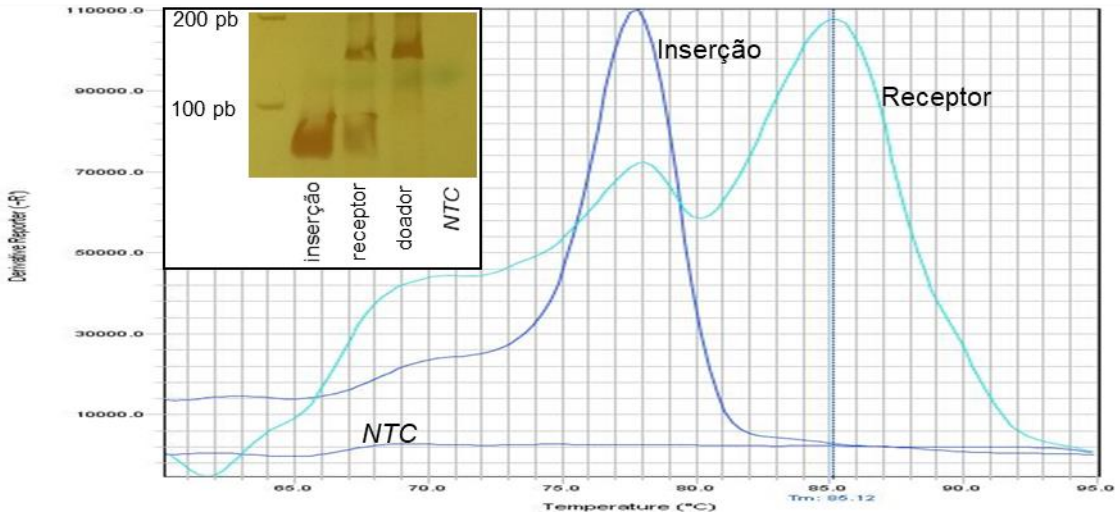

Figura 17. Gráfico de pico de *melting* do *locus InDel* M17 demonstrando a amplificação de dois diferentes fragmentos na amostra do receptor pós-transplante (azul claro). No detalhe, o produto de *qPCR* submetido a *PAGE*, evidenciando que a amplificação de um fragmento espúrio tanto na amostra do doador, quanto do receptor. *NTC: no template control.*

Caso 05

O Caso 05 apresentou apenas o *locus InDel* M2 como informativo. Nesse caso, o doador foi classificado como homozigoto deleção e o receptor homozigoto inserção. Os resultados da *InDel-qPCR* mostraram ausência do alelo *inserção* em todas as 12 amostras de *DNA* pós-transplante disponível para análise.

Caso 06

O Caso 06 apresentou apenas o *locus InDel* MID1386 como informativo. Em todas as 12 amostras coletadas pós-TMO, foram detectados um fragmento de *DNA* não correspondente a inserção. Este fragmento foi presente também da amostra do doador, usado como controle negativo da reação (**Figura 18**).

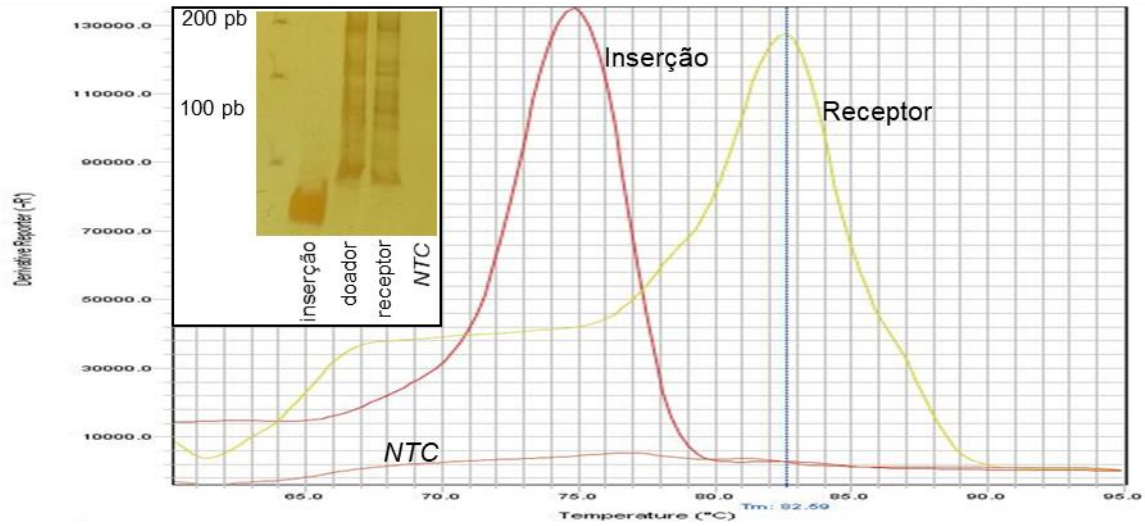

Figura 18. Gráfico de pico de *melting* do *locus InDel* MID1386 demonstrando a amplificação na amostra do receptor pós-transplante de um único fragmentos (amarelo) não correspondente ao alelo *inserção* (vermelho). No detalhe, o produto de *qPCR* submetido a *PAGE*, evidenciando que a amplificação de um fragmento espúrio tanto na amostra do doador, quanto do receptor. *NTC: no template control.*

Caso 07

O Caso 07 apresentou dois *loci InDel* informativos: MID1039 e M2. Na **Tabela 13** estão os resultados obtidos após a quantificação por *InDel-qPCR* das 10 amostras de *DNA* colhidas pós-TMO.

Tabela 13. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 07.

Amostra	MID1039			M2		
	DNA (ng/µL)	DP	CV (%)	*DNA* (ng/µL)	DP	CV (%)
0702	**			0,021	0,00	21,53
0703	0,046	0,00	8,21	0,053	0,00	4,07
0704	*			*		
0705	0,036	0,01	30,44	0,066	0,01	15,13
0706	0,026	0,01	26,12	0,103	0,00	2,79
0707	0,022	0,01	24,98	0,044	0,00	0,44
0708	0,026	0,02	25,51	0,066	0,01	4,47
0709	**			**		
0710	**			**		
0711	0,162	0,01	8,99	0,184	0,04	22,08

DP: Desvio padrão;
CV: Coeficiente de variação.
*Resultado negativo;
**Valor fora do limite de quantificação da curva-padrão.

Caso 08

O caso 08 não foi avaliado por *InDel-qPCR* por não apresentar *loci* informativos.

Caso 09

O caso 09 não foi avaliado por *InDel-qPCR* por não apresentar *loci* informativos.

Caso 10

O Caso 10 apresentou apenas o *locus* InDel L22 como informativo. Na **Tabela 14** estão os resultados obtidos após a quantificação por *InDel-qPCR* das sete amostras de *DNA* colhidas pós-TMO.

Tabela 14. Quantificação de *DNA* de amostras pós-transplante do caso 10.

Amostra	L22		
	***DNA* (ng/µL)**	**DP**	**CV (%)**
1002	5,419	0,82	14,76
1003	8,255	0,86	10,43
1004	**		
1005	11,710	1,61	13,77
1006	1,652	0,27	16,30
1007	**		
1008	**		

DP: Desvio padrão;
CV: Coeficiente de variação.
**Valor fora do limite de quantificação da curva-padrão.

QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL E FRAÇÃO DE DNA RESIDUAL

O *DNA* total presente nas amostras pós-transplante foi quantificado utilizando *primers* do gene endógeno β-actina em *qPCR*. A partir destes valores foi possível estimar a fração de *DNA* residual do receptor, calculada pela razão entre a quantidade de *DNA* residual e *DNA* total.

A quantificação do *DNA* total foi realizada somente para as amostras em que foi possível quantificar o *DNA* residual. Destas, duas amostras ficaram acima do limite de quantificação da curva-padrão, não sendo possível estimar a fração residual (**Tabela 15**).

Os resultados da quantificação de *DNA* total variaram de 2,43 ng/µL a 84,65 ng/µL, com média de 31,42 ng/µL e mediana de 25,43 ng/µL. A fração de *DNA* residual calculada variou de 0,065% a 40,6%, com média de 12,5% e mediana de 1,27%.

Tabela 15. Quantificação de *DNA* total e fração do *DNA* residual das amostras pós-transplante dos casos 02, 04, 07 e 10.

Amostra	β-actina			*DNA* residual (ng/µL)	Fração *DNA* residual (%)
	DNA (ng/µL)	DP	CV (%)		
0202	19,237	1,28	6,65	5,787	30,083
0203	2,433	0,21	8,60	1,266	52,029
0204	35,450	0,88	2,48	0,437	1,233
0205	5,599	0,06	1,14	2,273	40,600
0206	47,445	3,50	7,38	7,145	15,059
0402	30,824	0,79	2,56	0,125	0,405
0702	17,464	0,86	4,95	0,021	0,120
0703	75,419	2,59	3,44	0,049	0,065
0705	25,426	0,43	1,69	0,051	0,200
0706	13,164	0,74	5,62	0,064	0,486
0707	*			0,033	
0708	3,618	0,57	15,86	0,046	1,271
0711	24,435	2,90	11,85	0,173	0,708
1002	38,780	2,97	7,66	5,419	13,974
1003	47,370	1,30	2,75	8,255	17,427
1005	84,650	8,28	9,78	11,71	13,833
1006	*			1,652	

* Amostra acima do limite de quantificação da curva-padrão.
DP: Desvio padrão;
CV: Coeficiente de variação.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O objetivo desta pesquisa foi quantificar a concentração de *DNA* residual em pacientes receptores de Transplante de Medula Óssea, em diferentes períodos pós-transplante e verificar a utilidade do método *InDel-qPCR* para o monitoramento de quimerismo hematopoiético.

Entre os motivos de se monitorar o quimerismo pós-transplante em paciente submetidos a TCTH, podemos destacar: a) hematopoiese residual no paciente após um condicionamento mieloablativo está relacionada a falha no enxerto e persistência da doença de base (Hill et al., 1986; Mackinnon et al., 1994); b) quimerismo completo logo após o transplante está associando a maior incidência de doença enxerto contra hospedeiro (Jiang et al., 2014); e c) quimerismo misto está relacionado a maior risco de recaída da doença de base (Horky et al., 2011; Koldehoff et al., 2006; Lamba et al., 2004).

Esses dados em conjunto demonstram que o monitoramento rotineiro de quimerismo hematopoiético é uma abordagem útil para avaliar o prognóstico pós-transplante e justificar uso de terapias como imunossupressão ou infusões de linfócitos de doadores. Por este motivo, esforços tem sido feito no sentido de aumentar a sensibilidade das técnicas de detecção de quimerismo.

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA

Foram selecionados 11 *loci InDels* para a realização desta pesquisa. Não foi possível aumentar o número de *locus* analisados uma vez que a quantidade de amostras disponível (50µL) foi um fator limitante.

A análise do *loci InDels* para determinação fenotípica das amostras resultou em amplificações de bandas nítidas e alelos com migração eletroforética dentro da região e tamanhos esperados para cada *amplicon*. Esses resultados corroboram com a especificidade dos pares de *primers* flanqueadores para detecção dos *loci InDel* (Brazorotto, 2017; Rodrigues, 2018; Santos, 2014).

PADRONIZAÇÃO *INDEL-QPCR*

A eficiência de uma reação de *qPCR* é calculada a partir do valor de *slope* ou declividade da curva-padrão. Uma reação ideal tem eficiência de 100%, o que significa que a quantidade de *amplicons* dobra a cada ciclo durante a fase exponencial da reação, correspondendo a um *slope* de -3,32. Para obter resultados reprodutíveis são aceitáveis valores entre 90% e 110% (Thermo Fisher Scientific, 2016). Das nove curvas-padrão realizadas para quantificação de *DNA* residual e total, duas ficaram levemente abaixo dos valores desejáveis, porém não puderam ser repetidas por escassez de amostra.

O valor de R^2 (coeficiente de determinação) indica a linearidade da curva-padrão, sendo uma medida de quão próximo é o ajuste entre a regressão linear e os valores individuais de Ct das amostras padrão. O valor ideal é $R^2 = 1$, entretanto, 0,999 é o valor máximo alcançado geralmente (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Uma curva-padrão linear também implica que a eficiência da reação de amplificação é consistente com a variação da concentração da amostra. Se a curva-padrão se torna não-linear nas amostras de menor concentração, ela está próxima ao limite de detecção do ensaio. Amostras desconhecidas cujos valores de C_t estão na seção não linear da curva não podem ser quantificadas com acurácia. Os valores de R^2 das curvas de eficiência padronizadas foram sempre maiores que 0,971, indicando linearidade e precisão dos resultados.

A curva de dissociação é utilizada para verificar a formação de produtos inespecíficos, como dímeros de *primers* e fragmento espúrios, e assegurar a especificidade das reações de *qPCR*. Uma vez que a temperatura de *melting* (T_m) é influenciada do comprimento e composição do *amplicon*, é possível associar uma dada T_m a um alvo em particular (Stratagene, 2004). Em todos os ensaios para padronização da amplificação dos *loci InDel* selecionados, foi observado somente a produção de um único tipo de *amplicon* para cada *locus*.

Portanto, a eficiência das reações de *qPCR*, os coeficientes de determinação obtidos e a formação de um único pico na curva de dissociação demonstram que as condições laboratoriais aqui definidas são adequadas para quantificação de quimerismo hematopoiético por *primers* inserção-específicos em *InDel-qPCR*.

QUANTIFICAÇÃO DE QUIMERISMO HEMATOPOIÉTICO

Foram revisados todos os volumes de prontuários dos 10 pacientes (*n*=74). Foi possível observar a falta de um padrão nas anotações médicas, bem como ausência de resultados de exames. Somando-se às diferentes caligrafias, tornou-se uma tarefa árdua garimpar pelas informações necessárias, as quais nem sempre foram encontradas.

Por ser uma pesquisa para avaliar a eficiência da técnica, não visávamos quantificar todos os pares de doador/receptor, mas sim demonstrar a possibilidade de utilização da técnica nesses casos e sua correlação com o histórico clínico. Dos 10 casos inicialmente analisados, em sete foi possível aplicar a técnica de *InDel-qPCR.* Os resultados obtidos, sejam eles negativos (ausência do alelo *inserção*) ou positivos (presença do alelo *inserção*), foram corroborados pela evolução clínica dos paciente, e em alguns casos, evidenciaram quimerismo prévio ao relatado nos prontuários.

A seguir serão discutidos caso a caso os resultados encontrados após a quantificação do *DNA* residual dos receptores pelo método de *InDel-qPCR* inserção-específico, comparando-os à evolução clínica do paciente.

Caso 01

O paciente receptor do caso 01 apresentou recidiva da doença em D+108, a qual foi tratada com sucesso. Em D+474 foi descartada a possível recaída da doença de base, corroborada por resultados de biópsia de MO em D+706, indicando paciente em remissão.

A única amostra de *DNA* disponível para nossa análise foi coletada no D+656 pós-transplante. Os resultados da *InDel-qPCR* mostraram ausência do alelo *inserção*, o que é condizente com a evolução clínica observada.

Uma vez que paciente é do sexo masculino e o doador, feminino, um método de verificação de quimerismo é a análise de cariótipos. Coletas posteriores de amostras indicaram a presença significativa de quimerismo citogenético. Em D+5877, a presença de células com complemente sexual XY foi de 2%, passando a 26% em D+6059, 48% em D+6255, e 26% de células XY em D+6500.

A última passagem do paciente pelo HCFMRP-USP foi em 03/04/2018 (D+8362), porém não há informações no prontuário sobre a evolução da doença e tratamento após D+6500.

Caso 02

O paciente receptor foi submetido a exames de análise de *VNTR* em D+78 e D+106, os quais mostraram a presença de *DNA* 100% do doador, ou seja, ausência de quimerismo hematopoiético. Em D+536, ele foi diagnosticado com recaída molecular da LMC devido a presença da translocação BCR/ABL, resultado da fusão de parte do oncogene ABL com o gene BCR, proveniente da translocação entre os cromossomos 9 e 22, conhecido com cromossomo Philadelphia (Ph1). Em D+1474, foi identificada crise blástica extramedular, quando a LMC passa à fase blástica, com presença de doença extramedular, nesse caso, sarcoma granulocítico em membro inferior esquerdo. Para tratamento deste, iniciou-se quimioterapia e radioterapia.

Nossos resultados para D+78 e D+106 mostram quimerismo hematopoiético de 30 e 52%, respectivamente, contrariando o observado na análise de *VNTR* para o mesmo período. Em D+1390, o *DNA* residual estimado em 1,23% pode ser atribuída a má qualidade da amostra, pois o valor está muito discrepante das demais, sem justificativa clínica. Já o decréscimo observado na fração de *DNA* residual de 40% (D+1665) para 15% (D+1728) é condizente com o tratamento de quimioterapia e radioterapia empregados.

O último registro no prontuário data de 18/12/2005 (D+1865), sem registro de retornos ao HCFMRP-USP ou de óbito.

Caso 03

Este caso nos foi passado com a informação de que o TMO havia sido realizado em 24/01/2006, com coleta de *DNA* do receptor pré-TMO em janeiro de 2006. Entretanto, após análise do prontuário verificou-se que se tratava do segundo transplante. O primeiro TMO foi realizado em 14/04/2001, sendo que o paciente veio a óbito no D+174 do segundo transplante.

Desta forma, a coleta de *DNA* do receptor pré-TMO na realidade ocorreu pós-TMO, fato este que justifica os genótipos idênticos das amostras de doador e receptor em todos os 11 *loci InDel* analisados.

Caso 04

O paciente teve como doadora sua irmã, o que possibilitou análise de cariótipo para monitorar o quimerismo. Apesar de resultados de quimerismo citogenético variando entre 2 e 16% de D+356 a D+1959, a biópsia da MO mostrou ausência de infiltração neoplásica em D+1959.

A única amostra de *DNA* disponível para nossa análise foi coletada no D+4986 pós-transplante (26/10/2014). Os resultados da *InDel-qPCR* estimaram a fração de *DNA* residual em 0,4%, condizente com microquimerismo hematopoiético. Não há informação no prontuário do paciente sobre exames de monitoramento de quimerismo para essa data ou posterior.

Caso 05

Para essa paciente, no D+15 foi determinada a enxertia da medula óssea e, em D+97, a biópsia da MO mostrou ausência de implantação neoplásica.

As amostras pós-TMO disponíveis para análise por *InDel-qPCR* mostraram ausência do alelo *inserção* em todas as 12 amostras coletadas entre D+1189 e D+3548. Esses resultados são compatíveis com a evolução clínica da paciente receptora. A última passagem pelo HCFMRP-USP foi em 14/04/2018 (D+5667), permanecendo sem qualquer indicação de recidiva da LMC.

Caso 06

A biópsia de MO (D+369) desse paciente mostrou ausência de infiltrados neoplásicos. Em D+1321 e D+3548 foram realizadas análises de *VNTR* mostrando *DNA* 100% do doador. O último registro do paciente no HCFMRP-USP, data de 10/04/2018 (D+5242), permanecendo sem qualquer indicação de recidiva da doença de base.

A análise por *InDel-qPCR* do único *locus InDel* informativo neste caso mostrou ausência do alelo *inserção*, mesmo amplificando uma sequência de *DNA* inespecífica pertencente ao doador. O resultado negativo é compatível com o histórico clínico do paciente.

Caso 07

O paciente receptor do caso 07 apresentou recaída molecular em D+362, determinada pela presença da translocação BCR/ABL. Em D+631 foi realizada infusão de leucócitos do doador (*DLI*), uma estratégia para tratar paciente em recaída. Pela análise de cariótipo foi verificada a presença de 6% de células com complemento sexual XY (D+733) e em D+901 foi realizada segunda *DLI*. Nova recaída molecular foi diagnosticada em D+1587, sendo que em D+2603 a análise de cariótipo apresentava 34% de células XY.

Nossos resultados mostraram a presença de DNA residual (0,12%) na coleta de D+96, quando a pesquisa da translocação BCR/ABL deu negativa. Uma vez que em D+631 foi realizada *DLI*, era esperada redução no quimerismo (0,06%). Em D+733, o quimerismo hematopoiético ele passou a ser 0,2%, e em D+1587, 0,9%, quando foi determinada nova recaída molecular. As amostras coletadas em D+2967 e D+ 3331 tiveram a quantidade de *DNA* residual estimada em 1,27% e 0,71%, respectivamente. No mesmo período as pesquisas por translocação BCR/ABL retornaram negativas.

A última passagem desse paciente no HCFMRP-USP foi em 10/03/2015 (D+3331), sem mais registro da evolução clínica ou tratamento da LMC.

Caso 08

O paciente receptor do caso 08 apresentou resultado positivo (4%) na pesquisa por cromossomos Philadelphia. Em D+991, foi diagnosticada a recaída citogenética pela presença de 6% de células com complemento sexual XY, as quais aumentaram para 8% (D+1775), para 34% (D+2707) e por fim, 46% no D+2875. No prontuário não foram encontradas indicações do tratamento, entretanto, análises de *VNTR* em D+3253, D+3442 e D+4198 indicam a presença de *DNA* 100% do doador. A última

passagem do paciente pelo HCFMRP-USP data de 25/07/2017 (D+4814), sem indicações de recaída da doença de base.

Infelizmente, para esse caso, não houve *loci* informativos para quantificar o quimerismo hematopoiético nas 11 coletas pós-TMO disponibilizadas.

Caso 09

A paciente apresentou recaída em D+72, entrando em primeira remissão hematológica em D+219. Posteriormente, a paciente receptora foi diagnosticada com neoplasia secundária ovariana (D+409), indo a óbito no D+558.

Infelizmente, para esse caso, não houve *loci* informativos para quantificar o quimerismo hematopoiético nas sete coletas pós-TMO disponibilizadas.

Caso 10

O paciente receptor recuperou a medula óssea no D+14. Diagnóstico de recaída molecular em D+116, iniciando quimioterapia em D+128. Em D+224, o mielograma mostrou presença de 95% de blastos, determinando nova recaída hematológica. Esse número caiu para 21% (D+271) e 12% (D+288) quando iniciou-se quimioterapia e *DLI*. Paciente entrou em cuidados paliativos no D+326 quando número blastos na MO voltou a crescer (72%) e 91% em D+357. Paciente foi a óbito no D+416.

Nossos resultados estimam a fração de *DNA* residual de 14% em D+38. Em D+128, prévia à quimioterapia, a fração era de 17,4%, caindo para 13,8% em D+273. Resultados condizendo com a evolução clínica do paciente.

ESPECIFICIDADE DOS *PRIMERS INDEL*

Durante a padronização das reações de qPCR, sempre foram adicionados como controles negativos de reação: água em substituição de *DNA* (*NTC*) e uma amostra-padrão homozigota para o alelo *deleção* (*del/del*). Em todos os casos, houve ausência de amplificações dos controles negativos, evidenciando a especificidade

dos *primers* inserção-específicos. Portanto, foram utilizados para quantificação do quimerismo hematopoiético.

Entretanto, durante os ensaios de quantificação foram observados dois casos de amplificações espúrias, nos *locus* M17 e MID1386. Revendo as sequências das regiões flanqueadoras à inserção no *dbSNP* do *NCBI*, não observamos repetições de fragmentos que pudessem levar ao pareamento incorreto dos *primers* inserção-específicos. Uma vez que nos demais indivíduos homozigotos *del/del* testados não houve amplificação inespecífica, não soubemos justificar a alteração no DNA dos doadores destas amostras.

SENSIBILIDADE DE *PRIMERS* INSERÇÃO-ESPECÍFICOS EM *QPCR*

O quimerismo completo está normalmente associado com o baixo risco de recidiva e melhores prognósticos (Andreani et al., 2014). Entretanto, o significado das células residuais do receptor observadas após o TCTH permanece incerto. Há diversas razões: a) a presença frequente de células residuais após TCTH com desaparecimento tardio; b) diferenças na sensibilidade de técnicas empregadas para o monitoramento do quimerismo, o qual tem se tornado mais frequente devido a técnicas mais sensíveis de detecção; c) grande número de variáveis parecem influenciar o aparecimento de quimerismo misto, por exemplo, o regime de condicionamento, a depleção de células T, o número de células infundidas e o intervalo de tempo entre o transplante e coleta de amostra para quantificação (Barrios et al., 2003; Thiede et al., 2004).

A coleta das nossas amostras datam de 1995 a 2015. Por se tratar de um estudo retrospectivo, há algumas dificuldades implícitas, como a idade das amostras em si, as diversas variações de temperaturas sofridas (congelamento e descongelamento) e os diferentes métodos de extração empregados. Uma vez que ensaios de *qPCR* são especialmente influenciados pela qualidade, pureza e quantidade de DNA na amostra (Demeke e Jenkins, 2010), o método de extração de *DNA* empregado pode interferir nos resultados.

Efeitos inibitórios de solventes orgânicos, sais residuais, EDTA, detergentes iônicos, hemoglobina ou heparina de sangue heparinizado, são mais pronunciados na análise por *qPCR* (Koshy et al., 2017), podendo afetar a eficiência da amplificação e contribuir para a incerteza de medição. Isso foi demonstrado por Devonshire et al.

(2014) ao investigar diferentes métodos de extração de *DNA* livre de células (*cfDNA*) do plasma sanguíneo, constatando que o rendimento e a eficiência podem diferir em ordens de magnitude de acordo com o método de isolamento de *DNA* utilizado.

Apesar das variáveis apresentadas, nossos resultados demonstram que a técnica de *InDel-qPCR* com *primers* inserção-específicos tem sensibilidade elevada, detectando até 0,065% de quimerismo hematopoiético. Valor este superior ao obtido quando da análise por *STRs* (1 a 5%), método padrão de diagnóstico molecular de quimerismo (Kristt et al., 2005; Odriozola et al., 2013).

Nosso resultado é semelhante ao encontrado por Kim et al. (2014) ao utilizar o kit comercial *AlleleSEQR Chimerism Assay (Abbott Molecular, Santa Clara, CA)* com 34 marcadores *InDel*. Os autores alcançaram um limite de detecção de 0,11% e 0,024% utilizando *input* de 25 ng e 250 ng de *DNA*, respectivamente. Enquanto que o kit comercial *AutentiGEN® CHIMERISM Oligonucleotide (Sistemas Genómicos, Valencia,ES)* com 13 *loci InDels* gerou um limite de detecção de 0,01% de quimerismo hematopoiético (Vicente, 2016).

Ao comparar os resultados das quantificações obtidas para as amostras do caso 07, que foram informativas para dois *loci InDels*, nota-se que não há diferença significativa entre os valores. Resultados semelhantes foram obtidos por Brazorotto (2017) ao quantificar *DNA* fetal livre presente no plasma de parturientes utilizando a mesma metodologia descrita nesta pesquisa.

Uma vez que no presente estudo foram analisadas amostras de pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crônica, Anemia Aplástica Several e Leucemia Linfoblástica Aguda, é evidente a utilidade da *InDel-qPCR* para quantificação de quimerismo hematopoiético pós-TMO em diferentes doenças hematológicas.

INFORMATIVIDADE DOS *LOCI* INDEL

A análise dos fenótipos de nove pares receptor/doador revelou *loci InDels* informativos em 77,7% dos casos (**Tabela 9**). Estes dados estão de acordo com dados da literatura, que encontraram *loci* informativos em 80,3% de 61 pares receptor/doador testados (Jimenez-Velasco et al., 2005) e 83% de 41 pares (Vicente, 2016).

Os marcadores considerados mais informativos são aqueles cujas frequências alélicas mais se aproximam de 1/*n*, onde *n* é o número de alelos do *locus*. Assim, para *InDels* bialélicos, são aqueles em que as frequências se aproximam de 0,5 (Oka et al., 2014). No presente estudo, os *loci* mais informativos foram: M2, positivo para quatro casos, e L22, positivo para três casos, os quais apresentam frequência do alelo *inserção* (P*i*) de 0,5, aproximadamente (**Tabela 1**).

Considerando que, nesta pesquisa, os pares analisados são aparentados (transplantes alogênicos) e que estamos analisando polimorfismos bialélicos, para aumentar a informatividade do teste é necessário aumentar as possibilidade de análise. Isto pode ser feito com o acréscimo no número de *loci* testados, ou, uma outra opção, seria a utilização de um *primer* dirigido a sequência da deleção.

Quando o doador é homozigoto *in/in* e o receptor apresenta a sequência da deleção, em homo ou heterozigose (_/*del*), o *primer* deleção-específico será complementar às regiões imediatamente flanqueadoras à inserção, sendo assim, o pareamento completo do *primer* somente ocorrerá na ausência da inserção (Erro! Fonte de referência não encontrada.). O segundo *primer* a ser utilizado em conjunto com o deleção-específico terá pareamento com a região flanqueadora, de forma a permitir a produção de *amplicon*. Essa ideia ainda não foi testada quanto a sua eficiência na detecção de *DNA* em baixa concentração, mas é uma etapa futura na continuidade deste trabalho.

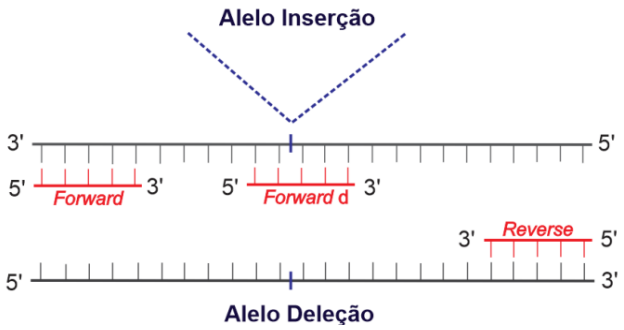

Figura 19. Esquema da posição relativa dos *primers* (em vermelho) a serem utilizados na detecção do alelo *deleção* (em azul). *Forward* e *Reverse* são *primers* flaqueadores à região *InDel*, enquanto que o *primer Forward* d é complementar à deleção.

Reanalisando a **Tabela 9** verificamos que há 13 situações em que usamos *primers* inserção-específico e outras 13 em que *primers* deleção específicos poderiam ser testados, aumentado a informatividade dos 11 *loci InDels* para 100%.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a realização desta pesquisa foram analisados um total de 11 *loci InDels*, que resultaram em informatividade em 77,7% dos casos dos pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea analisados.

Oito curvas-padrão foram padronizadas para quantificação do *DNA* residual dos receptores, além da β-actina para estimativa do *DNA* total e fração de *DNA* residual. A eficiência das reações de *qPCR*, os coeficientes de determinação obtidos e a formação de um único pico na curva de dissociação demonstram que as condições laboratoriais aqui definidas são adequadas para quantificação de quimerismo hematopoiético por *primers* inserção-específicos em *InDel-qPCR*.

Nossos resultados demonstraram a sensibilidade da técnica de detecção de 0,065% de quimerismo, com quantificações de *DNA* residual variando de 0,021 ng/μL a 11,71 ng/μL.

Por ser uma pesquisa para avaliar a qualidade da técnica, não visávamos analisar todos os pares de doador/receptor, mas sim demonstrar a possibilidade de utilização da técnica nesses casos e sua correlação com o histórico clínico. Assim sendo, os resultados obtidos (presença ou ausência do alelo *inserção*) foram condizentes com a evolução clínica dos pacientes, em alguns casos, evidenciando quimerismo prévio ao relatado nos prontuários.

Em suma, foi possível quantificar a concentração de *DNA* residual em pacientes receptores de Transplante de Medula Óssea, em diferentes períodos pós-transplante, atestando a utilidade do método *InDel-qPCR* para o monitoramento de quimerismo hematopoiético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABB, America's Blood Centers, American Association of Tissue Banks, American Red Cross, American Society for Apheresis, American Society for Blood and Marrow Transplantation, et al. Circular of Information for the Use of Cellular Therapy Products. American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2016.

Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood. 2002; 99(12):4618-25.

Andreani M, Testi M, Lucarelli G. Mixed chimerism in haemoglobinopathies: from risk of graft rejection to immune tolerance. Tissue antigens. 2014; 83(3):137-46.

Applied Biosystems. Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol. *Absolute and Relative Quantitation of Target DNA*. www.appliedbiosystems.com 2006: 68.

Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2015 Jan; 42(1):38-45.

Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. Haematologica. 2003; 88(7):801-10.

Besenbacher S, Liu S, Izarzugaza JM, Grove J, Belling K, Bork-Jensen J, et al. Novel variation and de novo mutation rates in population-wide de novo assembled Danish trios. Nature communications. 2015; 6.

Bird G, Gibson M, Wingham J, Mackintosh P, Watkins W, Greenwell P. Another example of haemopoietic chimaerism in dizygotic twins. British journal of haematology. 1980; 46(3):439-45.

Brazorotto ASP. Quantificação de DNA fetal por marcadores Inserção/Deleção no plasma de parturientes [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

Bryant E, Martin PJ. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following hematopoietic cell transplantation. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 2003:234-43.

Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez 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.

Chen X, Hofmann TJ, Otsuru S, Jethva R, Lind C, Monos D, et al. A strategy for single nucleotide polymorphism analysis of chimerism for somatic cell therapy. Cytotherapy. 2010 Dec; 12(8):1035-43.

Consortium GP. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015; 526(7571):68.

Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010; 396(6):1977-90.

Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. Analytical and bioanalytical chemistry. 2014; 406(26):6499-512.

Eikmans M, van Halteren AG, van Besien K, van Rood JJ, Drabbels JJ, Claas FH. Naturally acquired microchimerism: implications for transplantation outcome and novel methodologies for detection. Chimerism. 2014; 5(2):24-39.

Fuehrer M, Gerusel-Bleck M, Konstantopoulos N, Bender-Goetze C, Walther J-U. IFISH analysis of native smears from bone marrow and blood for the monitoring of chimerism and clonal markers after stem cell transplantation in children. International journal of molecular medicine. 2005; 15(2):291-7.

Haynes WJ, Jankowska-Gan E, Haynes L, Burlingham WJ. Microchimerism and regulation in living related kidney transplant families. Chimerism. 2014; 5(3-4):80-5.

Hertl M, Russell PS. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Merck Manual. 2013.

Hill RS, Petersen FB, Storb R, Appelbaum FR, Doney K, Dahlberg S, et al. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. Blood. 1986; 67(3):811-6.

Horky O, Mayer J, Kablásková L, Rázga F, Krejci M, Kissová J, et al. Increasing hematopoietic microchimerism is a reliable indicator of incipient AML relapse. International Journal of Laboratory Hematology. 2011; 33(1):57-66.

Hosoi T, Yahara K, Saji H, Ohtsuki Y. Blood chimeric twins. Vox sanguinis. 1977; 32:339-41.

Hwa H-L, Chung W-C, Chen P-L, Lin C-P, Li H-Y, Yin H-I, et al. A 1204-single nucleotide polymorphism and insertion–deletion polymorphism panel for massively parallel sequencing analysis of DNA mixtures. Forensic Science International: Genetics. 2018; 32:94-101.

Invitrogen. Real-Time PCR: from theory to pratice. *Basic principles of real-time PCR.* www.invitrogen.com: Invitrogen 2008: 37.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. Development. 2013 Jun; 140(12):2463-7.

Jiang Y, Turinsky AL, Brudno M. The missing indels: an estimate of indel variation in a human genome and analysis of factors that impede detection. Nucleic Acids Research. 2015:677.

Jiang Y, Wan L-p, Qin Y-w, Wang X-r, Yan S-k, Xie K-c, et al. Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. International journal of hematology. 2014; 99(3):323-8.

Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, Navarro G, Buno I, Castillejo J, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. Leukemia. 2005; 19(3):336.

Kim SY, Jeong MH, Park N, Ra E, Park H, Seo SH, et al. Chimerism monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using quantitative real-time PCR of biallelic insertion/deletion polymorphisms. The Journal of Molecular Diagnostics. 2014; 16(6):679-88.

Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. American journal of hematology. 2006; 81(10):735-46.

Koshy L, Anju A, Harikrishnan S, Kutty V, Jissa V, Kurikesu I, et al. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. Molecular biology reports. 2017; 44(1):97-108.

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.

Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi M, 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.

Lawler SD, Harris H, Millar J, Barrett A, Powles R. Cytogenetic follow-up studies of recipients of T-cell depleted allogeneic bone marrow. British journal of haematology. 1987; 65(2):143-50.

Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Blood. 1994; 83(11):3409-16.

Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, Champlin RE, Crawford S, Marks DI, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2015 Nov; 21(11):1863-9.

McCann S, Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. Bone marrow transplantation. 1993; 11(2):91-4.

Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. Genome Research. 2006; 16(9):1182-90.

Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. Genome research. 2011:gr. 115907.110.

Montgomery SB, Goode DL, Kvikstad E, Albers CA, Zhang ZD, Mu XJ, et al. The origin, evolution, and functional impact of short insertion–deletion variants identified in 179 human genomes. Genome research. 2013.

Ng AM. Validação de marcadores Inserção/Deleção para genotipagem fetal não invasiva [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2015.

Odriozola A, Riancho J, Colorado M, Zarrabeitia M. Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. International Journal of Immunogenetics. 2013; 40(2):88-92.

Oka K, Asari M, Omura T, Yoshida M, Maseda C, Yajima D, et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR. Molecular and cellular probes. 2014; 28(1):13-8.

PCRBiosystems. 2x qPCRBIO SYGreen Mix Separate-ROX. 2017 [cited 28/09/2018]; Available from: http://www.pcrbio.com/images/pdfs/manuals/2017_5/PB20.14%202x%20qPCRBIO%20SyGreen%20Mix%20Separate-ROX.pdf

Pearson H. Human genetics: Dual identities. Nature Publishing Group 2002.

Preuner S, Peters C, Potschger U, Daxberger H, Fritsch G, Geyeregger R, et al. Risk assessment of relapse by lineage-specific monitoring of chimerism in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2016 Jun; 101(6):741-6.

Reed W, Lee T-H, Norris PJ, Utter GH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism: a new complication of blood transfusions in severely injured patients. Seminars in Hematology; 2007: Elsevier; 2007. p. 24-31.

Rodrigues MLB. Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos do tipo InDel e detecção alelo-específica [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Romanini C, Romero M, Puerto MS, Catelli L, Phillips C, Pereira R, et al. Ancestry informative markers: inference of ancestry in aged bone samples using an autosomal AIM-Indel multiplex. Forensic Science International: Genetics. 2015; 16:58-63.

Sankaran VG, Weiss MJ. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. Nature medicine. 2015 Mar; 21(3):221-30.

Santos MD. Marcadores Inserção/Deleção na identificação humana pré-natal por método não invasivo [Dissertação]: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2014.

Santurtún A, Riancho J, Yañez L, Santurtún M, Zarrabeitia M. Analysis of post-transplant chimerism by using a single amplification reaction of 38 Indel polymorphic loci. Bone marrow transplantation. 2014; 49(11):1432-5.

Santurtún A, Riancho JA, Arozamena J, López-Duarte M, Zarrabeitia MT. Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. International journal of legal medicine. 2017; 131(1):67-72.

Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, Bossers B, van Erp F, de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. Obstetrics & Gynecology. 2010; 115(1):117-26.

Shao C, Lin M, Zhou Z, Zhou Y, Shen Y, Xue A, et al. Mutation analysis of 19 autosomal short tandem repeats in Chinese Han population from Shanghai. International Journal of Legal Medicine. 2016:1-6.

Stratagene. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Application Guide. *QPCR Chemistry Options*. www.stratagene.com 2004: 50.

Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer. 2008: 65.

Thermo Fisher Scientific. Real-time PCR handbook. *Basics of real-time PCR*. www.thermofisher.com/qpcr 2016: 74.

Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. American Journal of Pharmacogenomics. 2004; 4(3):177-87.

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

Tippett P. Blood group chimeras: a review. Vox sanguinis. 1983; 44(6):333-59.

Vicente DC. Quantificação do quimerismo após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas usando amplificação por PCR em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção dialélicos. 2016.

Wagner J, Dzijan S, Marjanovic D, Lauc G. Non-invasive prenatal paternity testing from maternal blood. International Journal of Legal Medicine. 2009 Jan; 123(1):75-9.

Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. The American Journal of Human Genetics. 2002; 71(4):854-62.

Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, Zabel M, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after transplantation for pediatric myelodysplastic syndrome: real-time or conventional short tandem repeat PCR in peripheral blood or bone marrow? Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2014; 20(12):1918-25.

APÊNDICES

Apêndice A. Dados dos pacientes analisados no presente estudo.

Caso	Sexo	Idade [a]	Diagn. [b]	Cond. [c]	Doador	TMO [d]	Células infundidas (células/Kg)	Óbito	Pront. [e]
01	M	37	LMC fase acelerada	Bu+Cy	Irmã	12/05/1995	$4,57x10^8$		7
02	M	24	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	09/11/2000	$4,70x10^8$		8
03	M	51	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	14/03/2001	$3,59x10^8$		12
		56	LMA	Flu+Bu	Irmão	24/01/2006	$8,99x10^8$	17/07/2006	
04	M	20	AAS	-	Irmã	02/03/2001	$4,74x10^8$		3
05	F	28	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmã	08/10/2002	$6,13x10^8$		3
06	M	21	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	03/12/2003	$4,20x10^8$		2
07	M	42	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmã	08/09/2004	$3,85x10^8$		3
08	M	16	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Mãe	20/05/2004	$4,20x10^8$		6
09	F	13	LLA	Cy+*TBI*	Irmã	24/10/2004	$4,86x10^8$	05/05/2007	9
10	M	43	LLA	Cy+*TBI*	Irmão	05/09/2005	$4,87x10^8$	26/10/2006	21

[a] Idade do paciente na data do TMO.
[b] Diagnóstico. LMC: Leucemia Mielóide Crônica; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; AAS: Anemia Aplástica Severa; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; Paciente 03 foi submetido a 2º TMO.
[c] Condicionamento. Bu: Bussulfan; Cy: Ciclosfosfamida; Flu: Fludarabina; *TBI*: Irradiação corporal total.
[d] Data do Transplante de Medula Óssea (TMO).
[e] Número de volumes do prontuário

Apêndice B. Dados das amostras pós-transplante dos pacientes analisados no presente estudo.

Caso	Amostra	Coleta	D+TMO [a]	ng/µL [b]
01	0100	04/05/1995	D-8	463,4
	0101			194,8
	0102	26/02/1997	D+656	302,0
02	0200	30/10/2000	D-10	771,7
	0201			296,0
	0202	26/01/2001	D+78	202,3

Caso	Amostra	Coleta	D+TMO [a]	ng/µL [b]
	0203	23/02/2001	D+106	223,8
	0204	30/08/2004	D+1390	327,5
	0205	01/06/2005	D+1665	385,9
	0206	03/08/2005	D+1728	469,1
03	0300	01/2006		550,7
	0301			767,8
	0302	24/02/2006	D+31	136,4
	0303	27/03/2006	D+62	252,8
	0304	25/04/2006	D+91	389,4
04	0400	29/01/2001	D-32	135,2
	0401			348,9
	0402	26/10/2014	D+4986	113,0
05	0500	16/04/2002	D-175	443,2
	0501			578,2
	0502	09/01/2006	D+1189	258,2
	0503	24/07/2006	D+1385	821,3
	0504	05/02/2007	D+1581	402,7
	0505	13/08/2007	D+1770	402,5
	0506	28/01/2008	D+1938	96,8
	0507	28/07/2008	D+2120	444,5
	0508	16/02/2009	D+2323	198,2
	0509	30/09/2009	D+2549	426,0
	0510	05/10/2010	D+2919	371,4
	0511	27/06/2011	D+3184	473,9
	0512	20/12/2011	D+3360	410,7
	0513	25/06/2012	D+3548	372,8
06	0600	26/11/2003	D-7	654,6
	0601			536,4
	0602	10/07/2006	D+950	153,4
	0603	15/01/2007	D+1139	196,7
	0604	16/07/2007	D+13211	263,5
	0605	21/01/2008	D+1510	341,2
	0606	23/06/2008	D+1664	239,3
	0607	09/02/2009	D+1895	109,7
	0608	10/08/2009	D+2077	231,8
	0609	01/02/2010	D+2252	71,7
	0610	03/08/2010	D+2435	443,2
	0611	14/08/2012	D+3177	312,6
	0612	19/02/2013	D+3366	175,6
	0613	20/08/2013	D+3548	213,8
07	0700	27/08/2004	D-12	360,1
	0701			350,1
	0702	13/12/2004	D+96	376,9
	0703	01/06/2006	D+631	248,9

Caso	Amostra	Coleta	D+TMO [a]	ng/µL [b]
	0704	29/06/2006	D+659	5,9
	0705	11/09/2006	D+733	494,4
	0706	12/01/2009	D+1587	29,3
	0707	13/04/2009	D+1678	172,7
	0708	26/10/2009	D+1874	20,9
	0709	23/10/2012	D+2967	261,7
	0710	22/10/2013	D+3331	252,0
	0711	10/03/2015	D+3835	88,6
08	0800	06/05/2004	D-14	466,2
	0801			346,6
	0802	22/05/2006	D+732	338,1
	0803	22/09/2008	D+1586	33,1
	0804	30/03/2009	D+1775	278,8
	0805	03/08/2010	D+2266	102,1
	0806	03/04/2012	D+2875	492,8
	0807	30/10/2012	D+3085	149,4
	0808	16/04/2013	D+3253	189,8
	0809	21/10/2013	D+3441	356,7
	0810	13/05/2014	D+3645	139,0
	0811	08/11/2014	D+3824	305,7
	0812	17/11/2015	D+4198	101,5
09	0900	03/09/2004	D-51	50,0
	0901			439,3
	0902	14/02/2006	D+478	332,2
	0903	28/03/2006	D+520	292,3
	0904	26/04/2006	D+549	171,3
	0905	01/06/2006	D+585	339,3
	0906	30/06/2006	D+614	271,1
	0907	21/08/2006	D+666	403,4
	0908	06/10/2006	D+712	326,2
10	1000	18/08/2005	D-18	758,8
	1001			370,2
	1002	13/10/2005	D+38	485,0
	1003	11/01/2006	D+128	361,5
	1004	25/05/2006	D+262	1036,4
	1005	05/06/2006	D+273	294,1
	1006	25/07/2006	D+323	212,1
	1007	28/07/2006	D+326	340,5
	1008	31/08/2006	D+360	262,1

[a] Número de dias pós-Transplante de Medula Óssea
[b] *NanoDrop ND1000 Spectrophotometer*

ANEXO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 09 de novembro de 2016.

Ofício nº 3760/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 13800/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"MONITORAMENTO DE QUIMERISMO HEMATOPOIÉTICO POR MARCADORES INSERÇÃO/DELEÇÃO",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 440ª Reunião Ordinária realizada em 07/11/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARCELA DAMBROWSKI DOS SANTOS
PROF. DR. AGUINALDO LUIZ SIMÕES (Orientador)
Depto. de Genética da FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br
www.hcrp.usp.br

MANUSCRITO

***Primers InDel*-específicos na quantificação de quimerismo hematopoiético**

Marcela D. Santos[1], Aline S. P. Brazorotto[1], Maria Luisa B. Rodrigues[1], Aguinaldo L. Simões[1].

[1] Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência:

Aguinaldo Luiz Simões, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14090-190, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail: alsimoes@fmrp.usp.br

RESUMO

Introdução: Métodos quantitativos sensíveis e acurados para monitorar o quimerismo hematopoiético após Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) são necessários para verificar o sucesso do enxerto, uma vez que os resultados influenciam a abordagem terapêutica. Método: A técnica de detecção de *DNA* baseada em *primers* inserção-específicos de marcadores genéticos do tipo *InDel* (Inserção/Deleção) foi avaliada quanto a sua utilidade em quantificar quimerismo em amostras de *DNA* em baixa concentração, em PCR em Tempo Real (*qPCR*). Para isso, amostras de *DNA* de dez pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea (TMO) foram analisados para quantificar a concentração de *DNA* residual em diferentes períodos pós-transplante. Os resultados obtidos pela *InDel-qPCR* foram comparados com a evolução clínica descrita nos prontuários. Resultados: As quantificações do *DNA* residual variaram de 0,021 ng/µL a 11,71 ng/µL, correspondendo a fração de 0,065%

a 40,6% do *DNA* total presente na amostra. Os resultados obtidos (presença ou ausência do alelo *inserção*) foram condizentes com a evolução clínica dos pacientes, em alguns casos, evidenciando quimerismo prévio ao relatado nos prontuários. Conclusão: Nossos dados demonstram a utilidade do método *InDel-qPCR,* baseada em *primers* inserção-específicos, no monitoramento de quimerismo hematopoiético.

Palavras-chave: InDel, Quantificação, qPCR, TMO, TCTH.

INTRODUÇÃO

Testes quantitativos sensíveis e acurados para monitorar o quimerismo hematopoiético são necessários para verificar o sucesso do enxerto em pacientes submetidos a Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH). O monitoramento rotineiro de quimerismo hematopoiético [(1-8)] é uma abordagem útil para avaliar o prognóstico pós-transplante e influenciar a abordagem terapêutica, como infusões de linfócitos do doador (*DLI – donor leukocyte infusion*), quimioterapia adicional ou retransplante [(9)]. Por este motivo, esforços tem sido feito no sentido de aumentar a sensibilidade das técnicas de detecção de quimerismo.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a concentração de *DNA* residual em pacientes receptores de Transplante de Medula Óssea, em diferentes períodos pós-transplante e verificar a utilidade do método *InDel-qPCR,* baseada na amplificação específica de alelos *inserção,* para o monitoramento de quimerismo hematopoiético.

MÉTODO

Amostras biológicas

Foram utilizadas amostras de *DNA* de 10 pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea (TMO) alogênico e seus respectivos doadores, provenientes do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -

Universidade de São Paulo (Tabela 1). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP, sob o número 13800/2016 e CAAE 61030016.2.0000.5440.

Tabela 1. Dados dos pacientes analisados no presente estudo.

Caso	Sexo	Idade [a]	Diagn. [b]	Cond. [c]	Doador	TMO [d]	Células infundidas (células/Kg)	Óbito	Pront. [e]
01	M	37	LMC fase acelerada	Bu+Cy	Irmã	12/05/1995	$4,57x10^8$		7
02	M	24	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	09/11/2000	$4,70x10^8$		8
03	M	51	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	14/03/2001	$3,59x10^8$		12
		56	LMA	Flu+Bu	Irmão	24/01/2006	$8,99x10^8$	17/07/2006	
04	M	20	AAS	-	Irmã	02/03/2001	$4,74x10^8$		3
05	F	28	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmã	08/10/2002	$6,13x10^8$		3
06	M	21	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmão	03/12/2003	$4,20x10^8$		2
07	M	42	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Irmã	08/09/2004	$3,85x10^8$		3
08	M	16	LMC 1ª fase crônica	Bu+Cy	Mãe	20/05/2004	$4,20x10^8$		6
09	F	13	LLA	Cy+*TBI*	Irmã	24/10/2004	$4,86x10^8$	05/05/2007	9
10	M	43	LLA	Cy+*TBI*	Irmão	05/09/2005	$4,87x10^8$	26/10/2006	21

[a] Idade do paciente na data do TMO.
[b] Diagnóstico. LMC: Leucemia Mielóide Crônica; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; AAS: Anemia Aplástica Severa; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; Paciente 03 foi submetido a 2º TMO.
[c] Condicionamento. Bu: Bussulfan; Cy: Ciclosfosfamida; Flu: Fludarabina; *TBI*: Irradiação corporal total.
[d] Data do Transplante de Medula Óssea (TMO).
[e] Número de volumes do prontuário

Análise laboratorial

A fenotipagem das amostras dos pares receptor (pré-transplante) e doador foi realizada utilizando os pares de *primers* flanqueadores à região da inserção de 11 *loci InDels*, por *PCR* convencional [(10-12)]. Os resultados foram visualizados em eletroforese em gel poliacrilamida.

Após determinação dos *loci InDel* informativos, foi realizada padronização da *qPCR* utilizando os *primers* inserção-específicos em conjunto com o flanqueador complementar na presença de corante intercalante de DNA: *2x qPCRBIO SYGreen Mix + 50µM ROX Additive (PCR Biosystems)*. A curva de eficiência dos pares de *primers* inserção-específicos/franqueadores foi realizada com 6 diluições seriadas (1:4) de *DNA* controle, variando de 20 a 0,019 ng de *DNA*. O gene β-actina foi utilizado como controle endógeno

para quantificação do total de *DNA* presente em cada amostra pós-transplante e fração de quimerismo hematopoiético. Em todos os ensaios de *qPCR*, as amostras foram aplicadas em triplicata.

Quantificação de quimerismo

Para a quantificação do quimerismo hematopoiético foram utilizadas as amostras de *DNA* pós-transplante nos casos informativos, ou seja, quanto o doador foi classificado como homozigoto *del/del* e o receptor, heterozigoto *in/del* ou homozigoto *in/in*, em cada um dos *loci* avaliados. As curvas-padrão para quantificação foram construídas com amostras de *DNA*-padrão classificados como *in/del* ou *in/in*, previamente quantificados por fluorimetria (*Kit Quantifluor™ dsDNA System (TM346) - Promega*).

RESULTADOS

Dos 10 casos analisados, os casos 02, 04, 07 e 10 foram positivos para o alelo *inserção* e puderam ser quantificados (Tabela 2). Os casos 01, 05 e 06 foram negativos para a presença da sequência de inserção. Os casos 03, 08 e 09 não foram informativos para qualquer um dos 11 *loci InDel*.

Tabela 2. Quantificação de *DNA* total e fração do *DNA* residual das amostras pós-transplante dos casos 02, 04, 07 e 10.

Amostra	β-actina		*DNA* residual		Fração *DNA* residual (%)
	DNA (ng/µL)	DP	Média (ng/µL)	DP	
0202	19,237	1,28	5,787	0,26	30,083
0203	2,433	0,21	1,266	0,06	52,029
0204	35,450	0,88	0,437	0,12	1,233
0205	5,599	0,06	2,273	0,15	40,600
0206	47,445	3,50	7,145	0,15	15,059
0402	30,824	0,79	0,125	0,03	0,405
0702	17,464	0,86	0,021	0,00	0,120
0703	75,419	2,59	0,049	0,00	0,065
0705	25,426	0,43	0,051	0,02	0,200
0706	13,164	0,74	0,064	0,05	0,486
0707	*		0,033	0,02	
0708	3,618	0,57	0,046	0,03	1,271

0711	24,435	2,90	0,173	0,02	0,708
1002	38,780	2,97	5,419	0,82	13,974
1003	47,370	1,30	8,255	0,86	17,427
1005	84,650	8,28	11,71	1,61	13,833
1006	*		1,652	0,27	

* Amostra acima do limite de quantificação da curva-padrão.
DP: Desvio padrão.

DISCUSSÃO

Padronização *InDel-qPCR*

Foram realizadas nove curvas-padrão (InDel + β-actina) cuja eficiência das reações variaram de 72,96% a 110,4%. Para se obter resultados reprodutíveis, os valores desejáveis são de 90% a 110% [13]. O valor de R^2 (coeficiente de determinação) indica a linearidade da curva-padrão, sendo uma medida de quão próximo é o ajuste entre a regressão linear e os valores individuais de Ct das amostras padrão. O valor ideal é $R^2 = 1$, entretanto, 0,999 é o valor máximo alcançado geralmente [13]. Os valores de R^2 das curvas de eficiência padronizadas foram sempre maiores que 0,971, indicando linearidade e precisão dos resultados. A eficiência das reações de *qPCR*, os coeficientes de determinação obtidos e a formação de um único pico na curva de dissociação demonstram que as condições laboratoriais aqui definidas são adequadas para quantificação de quimerismo hematopoiético por *primers* inserção-específicos em *InDel-qPCR*.

Quantificação de quimerismo hematopoiético

Por ser uma pesquisa para avaliar a eficiência da técnica, não visávamos quantificar todos os pares de doador/receptor, mas sim demonstrar a possibilidade de utilização da técnica nesses casos e sua correlação com o histórico clínico. Assim, foram revisados todos os volumes de prontuários dos 10 pacientes (*n*=74). Dos 10 casos inicialmente analisados, em sete foi possível aplicar a técnica de *InDel-qPCR*. Os resultados obtidos, sejam eles negativos (ausência do alelo *inserção*) ou positivos (presença do alelo *inserção*), foram corroborados

pela evolução clínica dos paciente, e em alguns casos, evidenciaram quimerismo prévio ao relatado nos prontuários.

Sensibilidade dos *primers* inserção-específicos

Nossos resultados demonstram que a técnica de *InDel-qPCR* com *primers* inserção-específicos tem sensibilidade elevada, detectando até 0,065% de quimerismo hematopoiético. Valor este superior ao obtido quando da análise por *STRs* (1 a 5%), método padrão de diagnóstico molecular de quimerismo [5, 14]. Resultado semelhante ao encontrado por Kim, Jeong [15] ao utilizar o kit comercial *AlleleSEQR Chimerism Assay (Abbott Molecular, Santa Clara, CA)* com 34 marcadores *InDel*. Os autores alcançaram um limite de detecção de 0,11% e 0,024% utilizando *input* de 25 ng e 250 ng de *DNA*, respectivamente. Enquanto que o kit comercial *AutentiGEN® CHIMERISM Oligonucleotide (Sistemas Genómicos, Valencia,ES)* com 13 *loci InDels* gerou um limite de detecção de 0,01% de quimerismo hematopoiético [16].

Ao comparar os resultados das quantificações obtidas para as amostras do caso 07, que foram informativas para dois *loci InDels*, nota-se que não há diferença significativa entre os valores. Resultados semelhantes foram obtidos por Brazorotto [10] ao quantificar *DNA* fetal livre presente no plasma de parturientes utilizando a mesma metodologia descrita nesta pesquisa.

Uma vez que no presente estudo foram analisadas amostras de pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crônica, Anemia Aplástica Several e Leucemia Linfoblástica Aguda, é evidente a utilidade da *InDel-qPCR* para quantificação de quimerismo hematopoiético pós-TMO em diferentes doenças hematológicas.

Informatividade dos *loci InDels*

A análise dos fenótipos de nove pares receptor/doador revelou *loci InDels* informativos em 77,7% dos casos. Estes dados estão de acordo com dados da literatura, que encontraram *loci*

informativos em 80,3% de 61 pares receptor/doador testados [17] e 83% de 41 pares [16]. Os marcadores considerados mais informativos são aqueles cujas frequências alélicas mais se aproximam de 1/*n*, onde *n* é o número de alelos do *locus*. Assim, para *InDels* bialélicos, são aqueles em que as frequências se aproximam de 0,5 [18]. No presente estudo, os *loci* mais informativos foram: M2, positivo para quatro casos, e L22, positivo para três casos, os quais apresentam frequência do alelo *inserção* (P*i*) de 0,5, aproximadamente.

Considerando que, nesta pesquisa, os pares analisados são aparentados (transplantes alogênicos) e que estamos analisando polimorfismos bialélicos, para aumentar a informatividade do teste é necessário aumentar as possibilidade de análise. Isto pode ser feito com o acréscimo no número de *loci* testados, ou, uma outra opção, seria a utilização de um *primer* dirigido a sequência da deleção. Reanalisando os genótipos dos pares doador/receptor, verificamos que há 13 situações em que usamos *primers* inserção-específico e outras 13 em que *primers* deleção específicos poderiam ser testados, aumentado a informatividade dos 11 *loci InDels* para 100%.

CONCLUSÕES

Para a realização desta pesquisa foram analisados um total de 11 *loci InDels*, que resultaram em informatividade em 77,7% dos casos dos pacientes submetidos a Transplante de Medula Óssea analisados. Nossos resultados demonstraram a sensibilidade da técnica de detecção de 0,065% de quimerismo, com quantificações de *DNA* residual variando de 0,021 ng/µL a 11,71 ng/µL. Os resultados obtidos (presença ou ausência do alelo *inserção*) foram condizentes com a evolução clínica dos pacientes, em alguns casos, evidenciando quimerismo prévio ao relatado nos prontuários. Em suma, foi possível quantificar a concentração de *DNA* residual em pacientes receptores de Transplante de Medula Óssea, em diferentes períodos pós-

transplante, atestando a utilidade do método *InDel-qPCR* para o monitoramento de quimerismo hematopoiético.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Somos gratos ao Departamento de Genética (FMRP-USP) pelo suporte técnico e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFÊRENCIAS

1. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood. 2002;99(12):4618-25.

2. Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2015;42(1):38-45.

3. Chen X, Hofmann TJ, Otsuru S, Jethva R, Lind C, Monos D, et al. A strategy for single nucleotide polymorphism analysis of chimerism for somatic cell therapy. Cytotherapy. 2010;12(8):1035-43.

4. Hwa H-L, Chung W-C, Chen P-L, Lin C-P, Li H-Y, Yin H-I, et al. A 1204-single nucleotide polymorphism and insertion–deletion polymorphism panel for massively parallel sequencing analysis of DNA mixtures. Forensic Science International: Genetics. 2018;32:94-101.

5. Odriozola A, Riancho J, Colorado M, Zarrabeitia M. Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. International Journal of Immunogenetics. 2013;40(2):88-92.

6. Santurtún A, Riancho J, Yañez L, Santurtún M, Zarrabeitia M. Analysis of post-transplant chimerism by using a single amplification reaction of 38 Indel polymorphic loci. Bone marrow transplantation. 2014;49(11):1432-5.

7. Santurtún A, Riancho JA, Arozamena J, López-Duarte M, Zarrabeitia MT. Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. International journal of legal medicine. 2017;131(1):67-72.

8. Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. American Journal of Pharmacogenomics. 2004;4(3):177-87.

9. Jiang Y, Wan L-p, Qin Y-w, Wang X-r, Yan S-k, Xie K-c, et al. Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. International Journal of Hematology. 2014;99(3):323-8.

10. Brazorotto ASP. Quantificação de DNA fetal por marcadores Inserção/Deleção no plasma de parturientes [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

11. Rodrigues MLB. Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos do tipo InDel e detecção alelo-específica [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

12. Santos MD. Marcadores Inserção/Deleção na identificação humana pré-natal por método não invasivo [Dissertação]: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2014.

13. Thermo Fisher Scientific. Real-time PCR handbook. Basics of real-time PCR. www.thermofisher.com/qpcr2016. p. 74.

14. 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.

15. Kim SY, Jeong MH, Park N, Ra E, Park H, Seo SH, et al. Chimerism monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using quantitative real-time PCR of biallelic insertion/deletion polymorphisms. The Journal of Molecular Diagnostics. 2014;16(6):679-88.

16. Vicente DC. Quantificação do quimerismo após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas usando amplificação por PCR em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção dialélicos. 2016.

17. Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, Navarro G, Buno I, Castillejo J, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. Leukemia. 2005;19(3):336.

18. Oka K, Asari M, Omura T, Yoshida M, Maseda C, Yajima D, et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR. Molecular and cellular probes. 2014;28(1):13-8.