UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
SETOR DE MEDICINA LEGAL

Microquimerismo - implicações nos testes de identificação genética

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas - Patologia Experimental.

Ricardo Marcelo Abrão

Orientadora: Profª. Drª. Carmen Cinira Santos Martin
Assessor: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto
Outubro de 2001

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca Central do Campus
Administrrativo de Ribeirão Preto / USP

Abrão, Ricardo Marcelo
Microquimerismo: implicações nos testes de identificação genética. -- Ribeirão Preto, 2001.
76 p. il. ; 30cm

Bibliografia: p. 67-76
Dissertação de Mestrado apresentada à FMRP-USP/Depto Patologia/Setor de Medicina Legal
Orientador: Martin, Carmen Cinira Santos
Assessor: Simões, Aguinaldo Luiz

1. Microquimerismo 2. Identificação genética

As pegadas do Senhor

"Uma noite tive um sonho... Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e através do céu, passavam-se cenas da minha vida.

Para cada cena que se passava, percebi que eram deixado dois pares de pegadas na areia, um era o meu e o outro era do Senhor. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei, também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiados do meu viver. Isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor: 'Senhor tu me disseste que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixastes'.

O Senhor me respondeu: "Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu te carreguei nos braços..."

Na vida existem palavras
tão pequenas e que são capazes de
expressar infinitas maravilhas:
paz, mar, céu, sol e dentre outras,
não poderia faltar
Pai e Mãe!

Aos meus pais, Ebraim e Geralda.
Exemplos a serem seguidos.

A minha família: "Vó Mafalda",
meus irmãos Alexandre e Gisele,
meus cunhados Fernanda e Ricardo
e ao nosso anjo Isabela,
por preencherem minha vida.

À Ana Carla, por dar cor e
razão ao meu dia-a-dia.

Agradecimentos especiais

Aos meus orientadores
Profª. Drª. Carmen Cinira Santos Martin
Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões
Por guiarem meus passos neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Guimarães
Por aceitar fazer parte da banca julgadora, pela amizade e pela imensa colaboração na arte final do trabalho.

Aos Professores
Antônio Carlos Agostinho
Paulo Roberto Félix
Por despertarem minha vocação.

Às queridas
Ana Lúcia Pimentel
Maria do Carmo Tomitão Canas
Neide Terezinha Gonçalves
"Se todos fossem iguais à você...!"

Aos pacientes
No momento em que mais precisavam de ajuda, foram eles que me ajudaram.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, chefe do Departamento de Patologia da FMRP-USP.

Ao Prof. Dr. Luiz César Peres, coordenador do curso de pós-graduação do Departamento de Patologia da FMRP-USP.

À seção de Pós-graduação da FMRP-USP.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À secretaria do Departamento de Patologia da FMRP-USP: Neide, Regina, Rosângela e Rodrigo.

Aos amigos do SVOI: Tadeu, Edílson, Luís, Toninho, Walter, Daniel, Silvio, Regina, Lúcia, Dr. Félix, Drª Bete, Dr. Dayr.

Aos amigos do CEMEL: Cristina, Edith, Ângela, Alfredo, Stéfano, Dr. Bruno, Dr. Melki, Dr. Jair, Dr. Cássio.

Aos médico-legistas e funcionários do IML que integram agora o CEMEL.

A todos os docentes, colegas pós-graduandos, estagiários e funcionários do Departamento de Patologia da FMRP-USP.

À enfermaria da sala de transfusão ambulatorial do Hemocentro de Ribeirão Preto: Luciana, Sálua, Célia, Maria Franzoni, Maria Tereza, Geraldo, Marilda, Dirce. Pessoas que não mediram esforços para a coleta das amostras dos pacientes.

Ao Banco de sangue do HCFMRP - Campus: Clara, Wilson, Paulo, Sebastião e especialmente à Drª. Rachel, quem muito colaborou para a coleta das amostras das bolsas de sangue transfundidas.

À enfermaria do centro de Recuperação de cirurgia torácica do HCFMRP - Campus, pela coleta das amostras dos pacientes após a cirurgia.

Ao Serviço de Documentação científica da FMRP - USP.

A Geraldo Cássio dos Reis, pelas análises estatísticas.

À Profª. Drª. Eucléia Primo Betioli Contel, então chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP.

À secretaria do Departamento de Genética da FMRP-USP.

Aos amigos do laboratório de genética com quem convivi e finquei raízes de minha vida: Adriana, Ana Lúcia, Ana Paula, Ana Silvia, Bete, Celso, Cláudia, Daniela, Débora, Eddy, Edna, Eliana, Fernanda, Giuliana, Juarez, Juliana, Jussara, Lenize, Lenice, Liliam, Malu, Marcelo, Maria, Mônica, Regina, Renata Camacho, Renata Simões, Rosana, Rubiani, Samuel, Sandra, Silviene, Talita, Yara.

A Deus, por estar sempre ao meu lado e me manter junto à pessoas maravilhosas!

ÍNDICE

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

I - INTRODUÇÃO **1**

Análise do polimorfismo genético 2

Microquimerismo 5

Hipótese de trabalho 8

II - OBJETIVOS **9**

III - MATERIAL E MÉTODOS **11**

Aspectos éticos da pesquisa 12

Obtenção das amostras 12

Mistura dos sangues 13

Mistura dos DNAs 14

Pacientes da sala de transfusão ambulatorial 15

Pacientes transfundidos na sala de cirurgia 18

Extração de DNA de leucócitos 21

Extração de DNA de *swab* bucal 21

Dosagem fluorimétrica 22

Análises estatísticas 22

Marcadores moleculares 23

Loci investigados *24*

STRs do fator de von Willebrand *24*

STRs localizados no cromossomo Y *26*

Amplificação do DNA (PCR) 28

Eletroforese em gel de poliacrilamida 30

Coloração 32

Reagentes e soluções 33

IV - RESULTADOS **35**

Concentrações de DNA 36

Comparações entre as amostras *42*

Mistura dos sangues e Mistura dos DNAs 43

STRs autossômicos *43*
STRs Y *47*
Pacientes transfundidos 50
V - DISCUSSÃO 58
VI - CONCLUSÕES 63
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: mistura de sangues.....14

Tabela 2: mistura dos DNAs.....14

Tabela 3: relação e dados para identificação dos pacientes
da sala de transfusão ambulatorial.....16

Tabela 4: relação do número de bolsas, volumes e o tipo de
hemocomponente recebido pelos pacientes na sala de transfusão ambulatorial.....17

Tabela 5: relação e dados para identificação dos pacientes
transfundidos na sala de cirurgia.....19

Tabela 6: relação do número de bolsas, volumes e o tipo de
hemocomponente recebido pelos pacientes na sala de cirurgia.....20

Tabela 7: STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y estudados.....24

Tabela 8: Condições específicas para eletroforese
de cada *locus* polimórfico estudado.....32

Tabela 9: Concentrações de DNA das amostras colhidas
na sala de transfusão ambulatorial.....36

Tabela 10: Concentrações de DNA das amostras colhidas
na sala de cirurgia.....40

Tabela 11: Comparações entre as concentrações das amostras
dos pacientes transfundidos.....42

Tabela 12: Comparações das amostras dos pacientes
politransfundidos com os pacientes da cirurgia.....42

Tabela 13: Relação do nº de bolsas recebidas / nº de bolsas de doadores homens.....55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do intron 40 do gene de von Willebrand....25
Figura 2: Mapa do cromossomo Y....27
Figura 3: mistura de sangues - sistema vWF1....44
Figura 4: mistura de sangues - sistema vWF2....44
Figura 5: mistura de sangues - sistema vWA....44
Figura 6: mistura de sangues - sistema TH0....45
Figura 7: mistura de sangues - sistema TPOX....45
Figura 8: mistura de DNAs - sistema TPOX....46
Figura 9: mistura de DNAs - sistema vWF1....46
Figura 10: mistura de DNAs - sistema vWA....46
Figura 11: mistura de sangues - sistema DYS19....48
Figura 12: mistura de sangues - sistema DYS390....48
Figura 13: mistura de sangues - sistema DYS391....48
Figura 14: mistura de DNAs - sistema DYS392....49
Figura 15: mistura de DNAs - sistema DYS393....49
Figura 16: sistema vWF1 - paciente 5....51
Figura 17: sistema vWA - paciente 10....51
Figura 18: sistema TH0 - paciente 12....51
Figura 19: sistema vWF1 - paciente 15....52
Figura 20: sistema TPOX - paciente 19....52
Figura 21: sistema vWF1 - paciente 16....52
Figura 22: sistema vWF1 - paciente 11....54
Figura 23: sistema vWA - paciente 11....54
Figura 24: sistema TH0 - paciente 11....54
Figura 25: sistema DYS19 - paciente 22....56
Figura 26: sistema DYS390 - paciente 22....56
Figura 27: sistema DYS391 - paciente 10....56
Figura 28: sistema DYS392 - paciente 22....57
Figura 29: sistema DYS393 - paciente 22....57

Resumo

O termo *quimerismo* descreve a presença de populações de células de diferentes indivíduos em um receptor enquanto *microquimerismo* é usado quando essa população de células do doador é muito inferior em número à do receptor. Esta situação pode ocorrer nos pacientes submetidos aos transplantes de medula óssea e órgãos, transfusão sangüínea e gravidez. Algumas patologias, como por exemplo anemia, talassemia e anemia aplásica deixam o paciente dependente de transfusões sangüíneas.

O presente trabalho teve como objetivos: 1) saber qual a quantidade mínima de sangue, em uma mistura, necessária para se detectar o DNA contaminante pela técnica de PCR e; 2) verificar a presença de DNA do doador através da extração do DNA do sangue de pacientes submetidos à transfusão sangüínea.

Utilizando-se técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a detecção de microquimerismo em pacientes que receberam transfusão sangüínea. Foi feita uma mistura dos sangues e dos DNAs, estocados no laboratório, utilizando amostras com tipagens conhecidas em volumes diferentes variando a concentração de 5% à 50% de uma amostra em relação à outra. De 30 pacientes transfundidos, sendo 18 pacientes da sala de transfusão ambulatorial e 12 transfundidos durante cirurgias cardíacas, foram colhidas amostras de sangue pré e pós-transfusão. Todas as amostras foram testadas usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com 10 marcadores do tipo STR sendo 5 autossômicos (vWF1, vWF2, vWA, TPOX e TH0) e 5 ligados ao cromossomo Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393).

Na mistura dos sangues e dos DNAs, quando utilizados os marcadores moleculares autossômicos (vWF1, vWF2, vWA, TPOX e TH0), foi encontrado um sinal de contaminação a partir de uma concentração maior ou igual a 10% de um sangue em relação ao outro. Quando foram utilizados os marcadores moleculares ligados ao cromossomo Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) a detecção do DNA contaminante (masculino) se deu a partir de uma concentração maior ou igual a 5%.

O microquimerismo não foi encontrado em nenhum paciente transfundido. Os resultados demostraram que a contaminação por transfusão sangüínea não foi capaz de mascarar os resultados em quem faz teste para investigação de paternidade, resultando desnecessárias as preocupações tão comuns quanto à possibilidade de falseamento de resultados por transfusão do suposto pai.

Summary

The term chimerism describes the presence of populations of different individuals' cells in a receiver and the term microchimerism is used when the population of the donor's cells is very reduced in number in comparasion to that of the receiver. This situation can happen in patients submitted to bone marrow and organs transplants, blood transfusion and pregnancy. Some pathologies, as anemia, thalassemia and aplastic anemia become the patient dependent of blood transfusions.

This work had as objectives: 1) to know which the minimum amount of blood necessary in a mixture to detect contaminant DNA by PCR technique and; 2) to verify the presence of the donor's DNA through the extraction of DNA from the patients' blood submitted to the blood transfusion.

Using techniques of molecular biology, it has become possible microchimerism detection in patients whose received blood transfusion. A mixture of bloods and of DNA, was prepared and stored in the laboratory, using samples with know typing in different volumes, varying the concentration from 5% to 50% of a sample in relation to the other. Among 30 transfused patients, 18 from the room of ambulatorial transfusion and 12 from heart surgeries, samples of blood were picked pré and pos-transfusion. All samples were tested using the Polymerase Chain Reaction (PCR) with 10 markers of the STR type being 5 autossomics (vWF1, vWF2, vWA, TPOX and TH0) and 5 linked to the chromosome Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 and DYS393).

In the blood and DNA mixtures, when autossomic molecular markers were used (vWF1, vWF2, vWA, TPOX and TH0), it was found signs of contamination starting from concentrations equal or larger than 10% of a blood in relation to the other. When linked molecular markers were used to the chromosome Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 and DYS393) the detection of contaminant DNA (masculine) it noticed starting from concentrations equal or langer than 5%. Microchimerism was not found in any transfused patient. The results showed that contamination through blood transfusion did not mask results of men submitted to paternity investigation, what shows that the common concerns related to the possibility of false results related to blood transfusion in the putative father are not supported.

I - INTRODUÇÃO

ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO

Tem-se desejado um método capaz de identificar um indivíduo com total certeza, na tentativa de elucidar os processos civis e criminais (Chakraborty & Kidd, 1991; Shapiro & Reifler, 1996; Lee e cols., 1997; Chakraborty e cols., 1999; França, 2001). Para isto, a análise do DNA tornou-se muito importante.

O DNA possui regiões hipervariaveis e tais regiões são constituídas de pequenas seqüências de bases que se repetem *in tandem* (Wyman & White, 1980). Tais regiões são também chamadas de minissatélites, quando a seqüência repetitiva tem mais de 6 bases (Bell & Rutter, 1982).

Neste caso, o polimorfismo resulta das diferenças observadas no número das seqüências repetidas, sendo conhecido como VNTR, sigla para *Variable Number of Tandem Repeats* (número variável de repetições em tandem), que é caracterizado pela repetição consecutiva (in tandem) de uma seqüência de nucleotídeos que varia em número de indivíduo para indivíduo em um determinado *locus* (Nakamura e cols., 1987).

Em 1991, vários polimorfismos nos quais são encontradas repetições de seqüências compostas por 2 a 6 bases foram descritas e chamadas de STR (*Short Tandem Repeats*) ou simplesmente, microssatélites (Edwards e cols., 1991a; Edwards e cols., 1991b; Polymeropoulos e cols., 1991a, 1991b, 1991c). Estes polimorfismos possuem a mesma estrutura básica dos VNTRs, mas a seqüência que se repete são de apenas 2 a 6 bases (Sprecher e cols., 1996).

A grande vantagem de se analisar VNTRs para a identificação de indivíduos é que se tratam de regiões hipervariáveis. Embora cada indivíduo apresente no máximo dois alelos diferentes, muitos alelos podem estar presentes na população. Isto se deve ao fato de que a repetição de seqüências idênticas ou muito semelhantes na região dos minissatélites pode causar erros no alinhamento dos cromossomos homólogos, o que acarreta *crossing-over* desigual durante a

meiose, produzindo alelos com número de cópias aumentadas ou diminuídas em relação à seqüência repetida original. Dessa forma, apesar da posição dos VNTRs ser constante no genoma humano, o número de seqüências repetidas em cada VNTR é altamente variável entre os indivíduos (Farah, 1997).

Os STRs apresentam alta heterozigose (Kidd e cols., 1991; Schneider, 1997), não apresentam amplificação inexata nem problemas estatísticos devido ao agrupamento de alelos (Wall e cols., 1993); são facilmente analisados mesmo quando o DNA está parcialmente degradado ou está disponível apenas em quantidade limitada (Kasai e cols., 1990; Farah, 1997). Os STRs podem ser evidenciados com a amplificação de fragmentos de apenas 100 a 300 pb (Schumm, 1996), fato que tem feito deles marcadores úteis para os recentes mapas genéticos (Murray e cols., 1994; Adamson e cols., 1995), a identificação genética (Lins e cols., 1996) e os estudos populacionais (Gill & Evett, 1995).

Para a detecção dos VNTRs atualmente utiliza-se a PCR, sigla para *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase), que detecta um único VNTR no genoma e produz um padrão de uma ou duas bandas para cada indivíduo, dependendo se ele é homo ou heterozigoto para aquele *locus* (Schumm, 1996).

A PCR consiste na amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, explorando a capacidade de duplicação do mesmo, visando a produção de milhões de cópias desta seqüência de uma maneira simples e rápida (Newton, 1995).

Na reação de amplificação (PCR) conseguem-se cópias de milhares de fragmentos de DNA de cada alelo que são analisados por eletroforese (Gelfand, 1989; Newton, 1995). No entanto, deve-se realizar uma reação para cada *locus* de STR e para cada pessoa analisada (Schneider, 1997).

Na espécie humana, herda-se um cromossomo materno e um paterno, e a segregação destas estruturas repetitivas segue a lei de Mendel (Jefreys e cols., 1985; Pena, 1997). Assim, detecta-se no filho um alelo de origem materna e outro de origem paterna.

Os testes de paternidade, pelo estudo do DNA, são realizados baseando-se no polimorfismo dos diversos minissatélites ou microssatélites. O polimorfismo é traduzido pela possibilidade de termos diversos alelos na população. Sendo assim, faz com que os achados de similaridade entre duas pessoas possam ter significado na caracterização de parentesco entre as mesmas. Além disso, as freqüências dos alelos na população são também importantes, pois um alelo de que a maioria das pessoas é portadora não serve para diferenciar indivíduos (Pestoni e cols., 1995; Nagai e cols., 1996).

Os STRs tornaram-se uma poderosa ferramenta para identificação humana (Chakraborty e cols., 1999; Thomson e cols., 1999), uma vez que os resultados podem ser obtidos de qualquer fonte de material biológico, desde que esta possua células nucleadas de onde possa ser extraído o DNA genômico, não se limitando às análises convencionais de grupos sangüíneos e sistemas protéicos que dependem da disponibilidade de sangue ou fluidos corporais relacionados (Farah, 1997; Schneider, 1997).

Os resultados da análise do DNA não dependem da natureza do material ou célula analisada, pois a informação está contida em todas as células de um indivíduo. Portanto, é possível fazer a análise do DNA através de amostras de saliva (Sweet e cols., 1997), sêmen (Dimo-Simonin e cols., 1997), bulbo capilar (Allen e cols., 1998), manchas de sangue (Cattaneo e cols., 1997) e material proveniente de exumações tais como ossos, dentes e tecidos remanescentes (Parsons & Weedn, 1997; Prado e cols., 1997).

A análise do DNA tornou-se mais precisa e confiável, mesmo utilizando pequenas quantidades de material, devido a alta sensibilidade da técnica de PCR. Tal sensibilidade se mostra de grande valia para a identificação genética quando se realiza análises de determinado material biológico contaminado com o DNA de outro indivíduo.

MICROQUIMERISMO

Na mitologia grega *Quimera* era um monstro composto por uma parte semelhante ao leão, outra à cabra e a região posterior como a de um dragão e estava sempre associado aos males feitos ao homem*.

Em Imunologia, o termo *quimerismo* descreve a presença de populações de células de diferentes indivíduos em um receptor e *microquimerismo* é usado quando essa população de células do doador é muito inferior em número à do receptor (Schechter e cols., 1997; Aractingi e cols., 2000).

No sentido mitológico, o monstro era formado por outros seres, e em nosso caso, a analogia é feita devido ao fato de que os pacientes convivam com as células de outros indivíduos. Esta situação pode ocasionar problemas de histocompatibilidade, rejeição celular, reações alérgicas, explicando assim a relação com "males feitos ao homem".

O microquimerismo pode ocorrer nos pacientes submetidos aos transplantes de medula óssea (Fontes e cols., 1994; Rolles e cols., 1994), órgãos (Starzl e cols., 1993; Ishida e cols., 1996; Elwood e cols., 1997), transfusão sangüínea (Adams e cols., 1992; Reed e cols., 1998; Reid e cols., 2000) e gravidez (Nelson e cols., 1998; Evans e cols., 1999).

Nos casos de transplantes de órgãos sólidos (fígado, rins) o microquimerismo ocorre devido as células tronco do doador presentes nesses órgãos se implantarem no receptor. A partir dai, como o receptor está imunossuprimido para evitar a rejeição do órgão, essas células tronco do doador começam a proliferar surgindo o microquimerismo após alguns dias do recebimento do transplante (Adams & Hutchinson, 1997; Triulzi & Nalesnik, 2001).

* www.oya-es.net

Devido ao implante de células tronco de fetos masculinos, que circulam nas mães após hemorragias feto-maternas durante a gestação, o microquimerismo pode estar associado à gravidez ocasionando esclerose sistêmica na mulher. Homens também podem ser afetados por implante de células tronco da mãe em fluxo inverso com hemorragias materno-fetais (Lo e cols., 1996; Lo e cols., 1997; Nelson, 1998; Evans e cols., 1999).

Outro exemplo de microquimerismo ocorre quando pacientes submetidos ao transplante heterólogo de medula óssea passam a apresentar na corrente sangüínea leucócitos produzidos pela medula óssea do doador (Lawler e cols., 1989; McDaniel e cols., 1994; Lo e cols., 1995; Zhang e cols., 1996).

Algumas patologias como anemia falciforme, talassemia e anemia aplásica deixam o paciente dependente de transfusões sangüíneas. Na transfusão, hemocomponentes de um ou mais doadores são transferidos ao receptor. Estes hemocomponentes podem ser separados em concentrados de hemáceas, de leucócitos, de plaquetas e de plasma. Todavia, a separação não é eficaz, tanto que sempre há leucócitos nesses concentrados, mesmo que em pequenas quantidades (Lee e cols., 1999).

Foi possível detectar a seqüência do gene do cromossomo Y em mulheres receptoras de múltiplas transfusões, permanecendo este sinal em média 2 dias após as transfusões (Adams e cols., 1992; Adams e Hutchinson, 1997; Reed e cols., 1998). Lee e cols. (1999) relataram a persistência de microquimerismo pós-transfusional acima de 1 ano e 6 meses em mulheres que receberam acima de 4 bolsas de concentrado de hemáceas. Por outro lado, os mesmos autores não detectaram microquimerismo depois de 14 dias em mulheres submetidas a cirurgias eletivas, nos quais receberam menor número de bolsas. Os autores atribuiram esta diferença ao tempo de estocagem das unidades de concentrados de hemáceas.

As análises em imunohematologia tornaram-se mais precisas e ganharam destaque na importância da prática, devido ao uso cada vez mais freqüente da terapêutica transfusional. Devido à necessidade de melhorar a segurança desse tratamento, foi necessária a cooperação de diversas áreas do conhecimento

médico, desde as conhecidas como básicas, até as diversas especialidades clínicas. Dentre essas áreas básicas, a genética tem sido cada vez mais utilizada (Jackson, 1990).

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular mais acuradas, tornou-se possível a detecção de microquimerismo com um número de células bastante inferior à do receptor.

HIPÓTESE DE TRABALHO

Os testes de paternidade pelo estudo do DNA podem ser obtidos de qualquer fonte de material biológico, desde que estes possuam células nucleadas de onde possa ser extraído o DNA genômico (van Huffel & Rouger, 1999).

Sendo assim, uma vez que, obtém-se DNA proveniente dos leucócitos, em casos de transfusão sangüínea, quando uma pessoa recebe o sangue de outra pessoa há uma mistura de sangues. Logo, esse receptor tem agora leucócitos do doador circulando em sua corrente sangüínea, então, ele também está com um DNA diferente do seu circulando em sua corrente sangüínea, mesmo que em pequena quantidade.

Mesmo com os avanços da biologia molecular, seria possível detectar o DNA do doador no sangue do receptor, pela técnica de PCR? Se este DNA contaminante (do doador) for detectado, circulando na corrente sangüínea do receptor, esta mistura pode influenciar os testes de paternidade e a identificação genética? Seria capaz a transfusão sangüínea de mascarar o DNA do receptor?

A aplicação deste conhecimento é rotina da identificação Médico-Legal e é pergunta constante se o acusado, ou investigado, sofreu transfusão sangüínea. Em outras palavras, seria possível um acusado "trocar" o seu sangue e, por isso, falsear o diagnóstico das características de seu DNA, fugindo de uma eventual condenação?

II - OBJETIVOS

Gerais:

Realizar a identificação genética de um indivíduo, partindo de uma mistura de DNA.

Específicos:

1) Verificar qual a quantidade mínima de sangue ou DNA, em uma mistura, necessária para ser detectado como DNA contaminante pela PCR, que possa interferir no resultado de um teste de paternidade.
2) Extrair o DNA do sangue de pacientes submetidos à transfusão sangüínea e verificar se há presença de DNA do doador.

III - MATERIAL E MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O protocolo de pesquisa foi submetido a revisão ética pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP, processo nº 2366/00, em sua 88ª Reunião Ordinária realizada em 26/06/2000, e aprovado. Foi também aprovado pela CONEP, registro 1504 de acordo com as atribuições da Resolução CNS 196/96, Processo nº 25000-016233/00, parecer nº 1066/2000.

Para a obtenção das amostras dos pacientes transfundidos, perguntou-se a cada indivíduo se concordava em participar do estudo, dando ao mesmo a oportunidade de negar sua participação, sem qualquer prejuízo dos benefícios (exames médicos e tratamentos que necessitasse). Após a concordância, cada indivíduo preencheu o Termo de Consentimento livre e esclarecido.

Para as amostras de sangue e DNA estocadas no laboratório, o Comitê de Ética em Pesquisa dispensou a assinatura dos sujeitos da pesquisa com base no item IV.3–C da resolução 196/96 do CNS, reiterada pelas informações constantes do *CADERNO DE ÉTICA EM PESQUISA* nº 1 de julho de 1998 ano I (páginas 21 e 22).

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas as amostras de sangue e DNA dos indivíduos que procuraram o serviço de Investigação de Paternidade da Clínica Civil do HCFMRP – USP, que encontravam-se estocadas no Laboratório de Genética e Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP - USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, onde foram realizadas as misturas conforme descrito nos itens "Mistura dos sangues" e "Mistura dos DNAs".

As amostras de sangue dos pacientes que receberam transfusão sangüínea foram divididas em dois grupos:

1) Pacientes da sala de transfusão ambulatorial do Hemocentro de Ribeirão Preto (18 pacientes).

2) Pacientes de cirurgia torácica do Departamento de cirurgia do HCFMRP - USP (12 pacientes).

Para a coleta das amostras de sangue dos 30 pacientes que receberam transfusão sangüínea foram colhidas duas amostras de 3mL de sangue venoso periférico antes e após a transfusão e foi coletado também um *swab* bucal antes da transfusão.

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa com tubo da marca *VacuTainer*, contendo EDTA como anticoagulante. Quando possível foi colhida também uma amostra da bolsa do hemocomponente que o paciente recebeu. Todas as amostras foram identificadas com o número dado ao paciente e com a indicação de ter sido obtida antes ou após a transfusão (pré ou pós-transfusão). Em seguida foram mantidas em geladeira à 16°C até o momento da análise.

MISTURA DOS SANGUES

Foram preparadas 3 misturas de sangue de 6 indivíduos diferentes, agrupados dois a dois, utilizando uma alíquota de sangue das amostras estocadas no laboratório. Foram utilizados tubos de polipropileno *(eppendorf)* com capacidade para 1,5mL, misturando-se duas amostras de sangue, aqui identificados como **sangue A (sg A)** e **sangue B (sg B)**, em volumes diferentes variando a concentração de 5% à 50% do sangue B em relação ao sangue A,

conforme descrito na Tabela 1. Os tubos 1 e 2 continham o sangue dos indivíduos com fenótipos pré-determinados.

Tabela 1: mistura dos sangues A e B indicando o volume de sangue (em µL) utilizado em cada tubo.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sg A	-	100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50
Sg B	100	-	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Concentração	-	-	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%

MISTURA DOS DNAs

Outras 3 misturas foram feitas com as amostras de DNA estocadas no laboratório. Estas amostras são referentes ao DNA genômico extraído do sangue de 6 pacientes diferentes dos pacientes da "mistura de sangues". Estas amostras de DNA foram primeiramente quantificadas pelo método fluorimétrico (descrito na pag.19) e misturadas duas a duas, utilizando uma alíquota da solução de DNA. Foram utilizados tubos de polipropileno *(eppendorf)* com capacidade para 1,5mL, misturando-se duas amostras de DNA com concentrações aproximadamente iguais, aqui identificados como **DNA A e DNA B**, em volumes diferentes variando a concentração de 5% à 50% do DNA B em relação ao DNA A, conforme descrito na Tabela 2. Os tubos 1 e 2 continham o DNA dos indivíduos com fenótipos pré-determinados.

Tabela 2: mistura dos DNAs A e B indicando o volume da solução de DNA (em µL) utilizado em cada tubo.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DNA A	-	100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50
DNA B	100	-	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Concentração	-	-	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%

PACIENTES DA SALA DE TRANSFUSÃO AMBULATORIAL

Não houve critérios de exclusão em relação ao sexo, idade, altura e peso para o interesse da pesquisa. Os pacientes (1-18) eram politransfundidos, retornando ao ambulatório mensalmente para a transfusão.

A primeira coleta de sangue foi feita antes da transfusão (pré-transfusão), junto com a coleta do *swab* bucal, e a segunda coleta, trinta minutos após o término da transfusão (pós-transfusão), colhendo o sangue de outro vaso sangüíneo diferente daquele da infusão. Foi colhida também uma amostra do conteúdo da bolsa do hemocomponente que o paciente recebeu.

Os pacientes nº 2, 3, 5, 7, 12, 13, 17 e 18 utilizavam equipo com filtro de retenção de leucócitos à beira do leito.

A volemia dos pacientes da sala de transfusão ambulatorial e da cirurgia foi calculada segundo a *American Association of Blood Banks* (1999), fazendo-se a estimativa da área da superfície corpórea (ASC) da seguinte forma:

$$ASC\ (m^2) = \sqrt{\frac{Altura(cm) \times Peso\ (Kg)}{3600}}$$

Após calculada a área da superfície corpórea em m^2, estimou-se a volemia de cada paciente da seguinte forma:

Para homens ----------2740mL/m^2

Para mulheres -------- 2370mL/m^2

A volemia de cada paciente foi calculada para estimar a porcentagem de sangue recebida por cada receptor e comparar com as misturas de sangue feitas no

laboratório. A relação dos pacientes contendo os dados de identificação, número de bolsas, volume e o tipo de hemocomponente recebido estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: relação e dados para identificação dos pacientes da sala de transfusão ambulatorial.

Paciente (Sexo)	Idade (em anos)	Altura (em cm)	Peso (em Kg)	Volemia aproximada (em mL)	Hipótese diagnóstica
1 (F)	14	146	46,7	3261	SB Talassemia
2 (F)	30	165	56,6	3817	B Talassemia
3 (F)	13	145	41,4	3060	B Talassemia
4 (F)	8	120	22,7	2061	B Talassemia
5 (F)	18	154	45,5	3306	B Talassemia
6 (M)	30	170	61,5	4669	Anemia Falciforme
7 (M)	67	170	73,5	5104	Leucemia Mielóide Aguda
8 (M)	14	145	41,3	3533	B Talassemia
9 (F)	64	160	64,0	3997	Leiomiosarcoma
10 (F)	73	160	52,4	3616	Anemia Falciforme
11 (M)	9	122	23,3	2434	Aplasia Medular
12 (M)	23	185	61,4	4867	B Talassemia
13 (M)	30	167	69,0	4902	Anemia Aplásica
14 (M)	25	180	69,0	5089	Leucemia Linfóide Aguda
15 (M)	22	178	64,5	4893	Anemia Falciforme
16 (M)	18	160	46,0	3917	Anemia de Fanconi
17 (F)	6	116	23,6	2066	Síndrome Mielo Displásica
18 (M)	12	140	36,8	3277	Anemia de Fanconi

Tabela 4: relação do número de bolsas, volumes e o tipo de hemocomponente recebido pelos pacientes na sala de transfusão ambulatorial.

Paciente (Sexo)	Volemia aproximada (em mL)	Unidades - Volume
1 (F)	3261	CHL - 240 mL CHL - 250 mL
2 (F)	3817	CHL - 220 mL CHL - 230 mL CHL - 230 mL
3 (F)	3060	CHL - 234 mL CHL - 240 mL
4 (F)	2061	CHL - 180 mL
5 (F)	3306	CHL - 180 mL CHL - 280 mL CHL - 220 mL
6 (M)	4669	CHBCL - 196 mL CHL - 216 mL CHL - 206 mL
7 (M)	5104	CHIL - 200 mL CHIL - 190 mL
8 (M)	3533	CHL - 260 mL CHL - 240 mL
9 (F)	3997	CHIL - 260 mL CHIL - 280 mL
10 (F)	3616	CHL - 260 mL CHL - 240 mL CHL - 156 mL
11* (M)	2434	CG - 160 mL
12 (M)	4867	CHIL - 250 mL CHIL - 230 mL CHIL - 240 mL CHIL - 240 mL
13 (M)	4902	CHIL - 250 mL CP - 180 mL
14 (M)	5089	CHIL - 230 mL CHIL - 220 mL CP - 10 unid. (45mL/unid.)
15** (M)	4893	CHL - 200 mL CHL - 100 mL CHIL - 330 mL CHIL - 320 mL CHIL - 330 mL CHIL - 310 mL CHIL - 230 mL CHIL - 220 mL
16 (M)	3917	CHL - 290 mL CHL - 230 mL CHL - 280 mL CP - 7 unid. (45mL/unid)
17 (F)	2066	CHIL - 180 mL CHIL - 200 mL
18 (M)	3277	CHIL - 230 mL CHIL - 120 mL CHIL - 260 mL

CHL - concentrado de hemáceas lavadas

CHIL - concentrado de hemáceas lavadas e irradiadas

CHBL - concentrado de hemáceas leuco-reduzidos

CG - concentrado de granulócitos

CP - concentrado de plaquetas

* O paciente foi hospitalizado para o procedimento.

** O paciente foi submetido primeiramente a uma sangria sendo as hemáceas desprezadas e o plasma reinfundido para depois receber as duas primeiras bolsas de hemáceas. No dia seguinte ao mesmo tempo que o paciente recebia a 3ª, 4ª, 5ª e 6ª bolsa era realizada a sangria. No ultimo dia não foi necessária a sangria e o paciente recebeu a 7ª e 8ª bolsa. Em todos os dias (exceto o primeiro) foram colhidas as amostras pré e pós-transfusão.

PACIENTES TRANSFUNDIDOS NA SALA DE CIRURGIA

Não houve critérios de exclusão em relação ao sexo, idade, altura e peso para o interesse da pesquisa e os pacientes (19-30) não haviam recebido transfusão sangüínea em nenhum momento até o da cirurgia.

A primeira coleta de sangue foi feita um dia antes da cirurgia (pré-transfusão), junto com a coleta do *swab* bucal, com o paciente ainda no quarto, e a segunda coleta, aproximadamente 6 horas após a cirurgia (pós-transfusão), quando o paciente encontrava-se na sala de recuperação colhendo o sangue de outro vaso sangüíneo diferente daquele da infusão.

Dentre os 12 pacientes transfundidos durante a cirurgia, não foi possível coletar a amostra das bolsas do hemocomponente de 5 pacientes (21, 24, 25, 27 e 30). As amostras de plasma fresco concentrado também não foram colhidas.

A relação dos pacientes contendo os dados de identificação, número de bolsas, volume e o tipo de hemocomponente recebido estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: relação e dados para identificação dos pacientes transfundidos na sala de cirurgia.

Paciente (Sexo)	Idade (em anos)	Altura (em cm)	Peso (em Kg)	Volemia aproximada (em mL)	Hipótese diagnóstica
19 (M)	59	168	58,8	4538	Coronariopatia
20 (M)	50	155	114,8	6091	Coronariopatia
21 (M)	60	180	105,5	6293	Coronariopatia
22 (F)	54	148	74,9	4158	Coronariopatia
23 (F)	22	166	66,7	4156	Valvulopatia
24 (M)	55	170	68,0	4909	Valvulopatia
25 (F)	3	96	12,2	1351	Correção átrio-ventricular
26 (F)	63	145	45,8	3218	Valvulopatia
27 (M)	48	180	69,8	5118	Coronariopatia
28 (M)	4	104	15,4	1827	Correção átrio-ventricular
29 (F)	17	150	58,6	3703	Valvulopatia
30 (F)	44	152	58,4	3721	Coronariopatia

Tabela 6: relação do número de bolsas, volumes e o tipo de hemocomponente recebido pelos pacientes na sala de cirurgia.

Paciente (Sexo)	Volemia aproximada (em mL)	Unidades - Volume
19 (M)	4538	CHL - 250 mL CHL - 350 mL CHL - 320 mL CHL - 350 mL PFC - 250 mL
20 (M)	6091	CHL - 400 mL CHL - 320 mL CHL - 310 mL
21 (M)	6293	CHL - 340 mL CHL - 320 mL
22 (F)	4158	CHL - 300 mL CHL - 310 mL CHL - 350 mL CHL - 360 mL CHL - 300 mL CHL - 370 mL
23 (F)	4156	CHL - 320 mL PFC - 180 mL
24 (M)	4909	CHL - 250 mL CHL - 320 mL
25 (F)	1351	CHL - 150 mL CHL - 210 mL
26 (F)	3218	CHL - 300 mL CHL - 310 mL CHL - 310 mL CHL - 320 mL PFC - 150 mL PFC - 150 mL PFC - 190 mL
27 (M)	5118	CHL - 330 mL CHL - 360 mL CHL - 320 mL PFC - 180 mL PFC - 150 mL PFC - 220 mL
28 (M)	1827	CHL - 140 mL PFC - 160 mL
29 (F)	3703	CHL - 290 mL
30 (F)	3721	CHL - 340 mL CHL - 330 mL PFC - 230 mL PFC - 230 mL

CHL - concentrado de hemáceas lavadas

PFC - plasma fresco concentrado

EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS

Tanto para as misturas de sangues, como para as amostras que foram coletadas dos pacientes transfundidos e as respectivas bolsas de hemocomponentes transfundidas, o DNA foi extraído segundo a metodologia descrita por Higuchi (1989), com pequenas modificações.

Em um tubo de polipropileno (*eppendorf*) com capacidade para 1,5ml, a uma alíquota de 100µL de amostra, foi acrescentado 1mL de tampão de lise de eritrócitos (Lise 1). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada à 6000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido até que o precipitado se apresentasse claro, indicando ausência de contaminação com hemoglobina (normalmente 3 vezes foram suficientes). Logo após, o precipitado foi ressuspendido em 300µL de tampão de lise de leucócitos (Lise 2), aos quais foram adicionados 5µL de proteinase K, seguindo-se incubação de pelo menos 1 hora à 65°C e 12 horas à 37°C. Ao final desta incubação a amostra foi aquecida à 94°C por 10 minutos para inativação da proteinase K e estocada à -20°C até o momento da análise.

EXTRAÇÃO DE DNA DE *SWAB* BUCAL

Os *swab*s bucais do tipo "escovinha" foram colhidos fazendo-se movimentos de rotação na parte interna da cavidade oral e colocados em tubo de polipropileno (*eppendorf*) de 1,5mL contendo 1mL de lise 1. O *swab* foi retirado do tubo e o tubo centrifugado a 6000 rpm por 1minuto. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento 300µL de lise 2 + 5µL de proteinase K. Mesmo os tampões sendo utilizados para lise de eritrócitos (Lise 1) e leucócitos (Lise 2), foi obtido sucesso para a extração de DNA de *swab* bucal. Após homogeneização a amostra foi incubada à 65°C por 1 hora e 12 horas à 37°C. Ao

final desta incubação a amostra foi aquecida à 94°C por 10 minutos para inativação da proteinase K e estocada à -20°C até o momento da análise.

DOSAGEM FLUORIMÉTRICA

Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas pelo método fluorimétrico utilizando-se o fluorímetro *DyNA Quant*™ *200 (Pharmacia)*. As amostras quantificadas foram: *swab* bucal, sangue pré-transfusão, sangue pós-transfusão, amostras das bolsas do hemocomponente que os pacientes receberam e amostras de sangue que fazem parte da rotina do serviço de investigação de paternidade.

A quantificação fluorimétrica pelo corante *Bisbenzimide* conhecido como Hoechst 33258 (H33258) (Loontiens e cols., 1991) já se mostrou eficiente na quantificação de baixas concentrações de DNA (Frau e cols., 1997; Bostock-Smith e cols., 1998). O método consiste no princípio do corante se ligar à dupla fita de DNA humano em solução desconhecida e esta solução ser exposta à uma luz filtrada de determinado comprimento de onda. Esta luz excita o complexo DNA-H33258 provocando luz, que é captada por um fotodetector para registro. Assim a medida fluorescente é um indicador direto da concentração de DNA.

Após as extrações de DNA, do sangue e do *swab* bucal, uma alíquota de 2μL foi retirada dos 300μL da solução de DNA e adicionada na cubeta utilizada no fluorímetro contendo 2mL da solução tampão, sendo então esta cubeta colocada no aparelho, previamente zerado e calibrado.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após realizadas as quantificações pelo método fluorimétrico e calculadas as concentrações de DNA, as amostras foram comparadas da seguinte forma:

- Comparação entre as amostras pré-transfusão X pós-transfusão de todos os pacientes transfundidos: foi utilizado o *Teste t de Student* para amostras pareadas, que compara as médias de dois conjuntos de dados correlacionados.
- Comparação entre as amostras Sangue rotina contra Pré-transfusão e Pós-transfusão: foi utilizado o *Teste t de Student* para amostras independentes, que compara as médias de dois conjuntos de dados não correlacionados.
- Comparação entre pacientes Politransfundidos (sala de transfusão) X pacientes Cirurgia para as variáveis *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão: foi utilizado o *Teste t de Student* para amostras independentes, que compara as médias de dois conjuntos de dados não correlacionados.
- Comparação entre as diversas bolsas de hemocomponente e sangue rotina (CHL X CHIL X CP X Sangue rotina): foi utilizado o *Teste da análise de variância* (ANOVA), que compara simultaneamente as médias de mais de dois conjuntos de dados não correlacionados e o teste *post hoc* de Tukey.

MARCADORES MOLECULARES

Foram utilizados em nosso estudo, 5 STRs autossômicos e 5 STRs ligados ao cromossomo Y (Tabela 7).

Três, dos cincos STRs autossômicos, estão localizados no gene do fator de von Willebrand (vWF1, vWF2 e vWA), muito utilizado em estudos de identificação genética, análises de ligação e estudos de populações humanas e evolução (Pena e cols., 1994; Casaña e cols., 1995a, b; Jorde e cols., 1995; Arpini-Sampaio e cols., 1999; Pagotto e cols., 1999; Silva-Jr e cols., 1999). Os outros dois STRs autossômicos são HUMTPOX e HUMTH01. O HUMTPOX está localizado no gene humano da tireóide peroxidase (Anker e cols., 1992) e o HUMTH01 está localizado no gene tirosina hidroxilase (Edwards e cols., 1991a). Dentre os vários microssatélites descritos na literatura, utilizamos aqueles que têm aplicações em análises populacionais, estudos antropogenéticos e investigações forenses, e dentre estes utilizamos cinco STRs localizados no cromossomo Y: DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 (Kayser e cols., 1997).

As técnicas para detecção destes polimorfismos já estão padronizados e são procedimentos de rotina no laboratório de genética (Pagotto e cols., 1999; Mendes Jr, 2001; Sousa, 2001).

LOCI Investigados

Tabela 7: STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y estudados.

Loci	Repetição	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Referências
VWA	TCTA TCTG TCCA	12q 13,3 – q13,2	138 (no mínimo)	Kimpton e cols., (1992)
VWF1	ATCT	12q	99-135	Peake e cols., (1990)
VWF2	ATCT	12q	154-182	Ploos & Reitsma (1990)
HUMTPOX	AATG	2p23-pter	220-256	Lins e cols., (1998)
HUM TH01	AATG	11p15-p15.5	146-190	Urquhart e cols., (1994)
DYS19	CTAT	Yp11,2	182-206	Kayser e cols. (1997)
DYS390	CTAT	Yq11,23	199-227	Kayser e cols. (1997)
DYS391	CTAT	Yq11,21	275-291	Kayser e cols. (1997)
DYS392	ATT	Y	236-263	Kayser e cols. (1997)
DYS393	GATA	Yp11,3	120-132	Kayser e cols. (1997)

STRs do Fator de von Willebrand

O Fator de von Willebrand (vWF) humano é uma glicoproteína plasmática complexa, multimérica, necessária para a aderência das plaquetas ao endotélio quando este é lesado e liga-se ao fator VIII na circulação estabilizando-o (Mancuso e cols., 1989); sua deficiência resulta na doença de von Willebrand (Sadler, 1994).

O gene para este fator está localizado no cromossomo 12, região p12-pter (Ginsburg e cols. 1985; Verweij e cols. 1985) sendo que um pseudogene, homólogo ao primeiro terço deste gene foi localizado no cromossomo 22 (Mancuso e cols., 1991). Foi construído um mapa de restrição que compreende 75% do *locus* e cerca de 33,8 quilobases foram seqüenciadas em ambos os filamentos de DNA, incluindo todas as regiões flanqueadoras exon-intron. O gene tem cerca de 178 Kb e contém 52 exons. Seus exons variam de 40 a 1379 pares de bases (pb) e, seus introns, de 97 pb a aproximadamente 19,9 Kb. Neste gene, foi identificada uma grande quantidade de seqüências repetitivas, incluindo 14 repetições de seqüências *Alu*, e uma região de aproximadamente 670 pb, localizadas no intron 40 (Figura1), compostas por repetições imperfeitas da seqüência TCTA, dentro da qual foram identificados três polimorfismos de repetições *in tandem*. Uma ocorre entre os nucleotídeos 1900-2000, denominada vWF1, outra entre os nucleotídeos 2200-2350, denominada vWF2 e a terceira, entre os nucleotídeos 1640-1794, denominados vWA (Mancuso e cols., 1989).

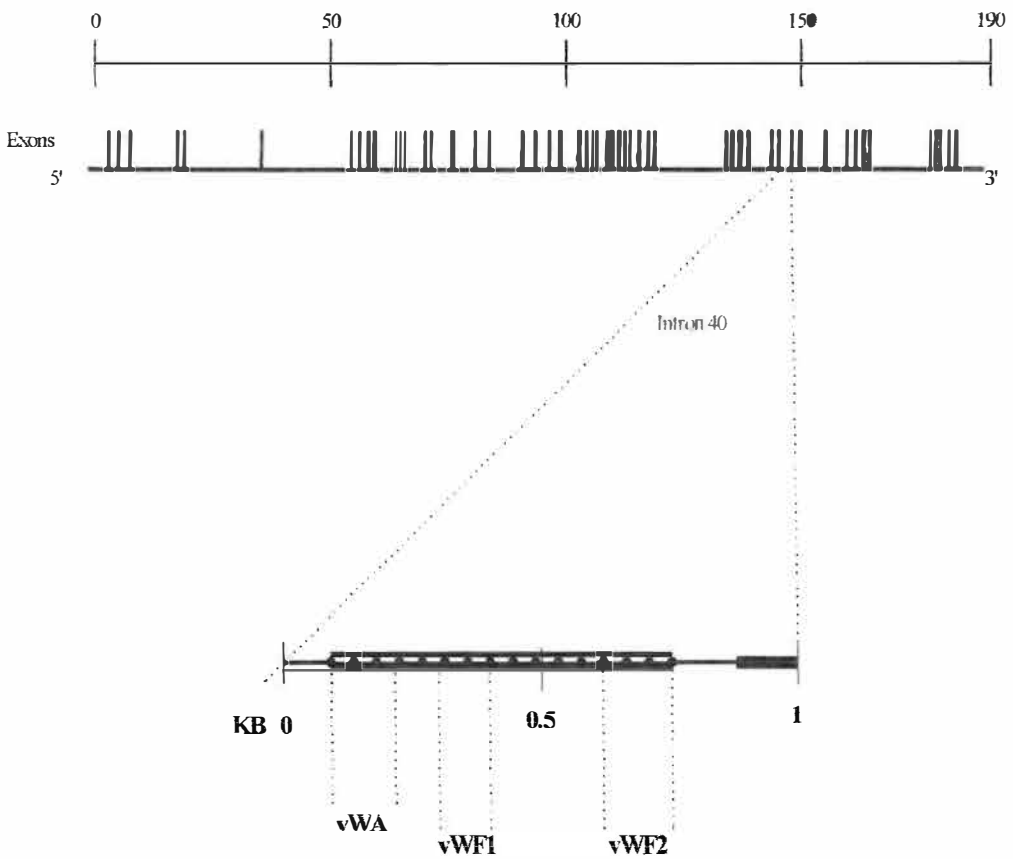


Figura 1: Mapa do intron 40 do gene de von Willebrand

Fator vW-VNTR I (número de acesso no GenBank: 800961), este STR é caracterizado por uma unidade de repetição de 4 pb. Situa-se *dowstream* ao vWA e sua amplificação pelos iniciadores descritos por Peake e cols. (1990) produz fragmentos com 99 e 135 pb (Haddad & Sparrow, 1997) totalizando 10 alelos, nomeados de 5 a 14 (Cumming e cols. 1992; Haddad & Sparrow, 1997), de acordo com o número de repetições.

VWA (HUMvWA31A): (número de acesso no GenBank: M25858), sua amplificação com os iniciadores descritos por Kimpton e cols. (1992) produzem fragmentos que variam de 126 a 166 pb. Atualmente, são conhecidos onze alelos com freqüências polimórficas, e nomeados de acordo com o número de seqüências repetidas que possuem (11 a 21 repetições).

Fator vW-VNTR2, (número de acesso ao GenBank: 800750) situa-se a 212 pb *dowstream* ao vWF1. Recentemente são conhecidos um total de 9 alelos, com tamanho variando de 154 a 186 pb nomeados de 9 a 17, quando utilizando os iniciadores descritos por Ploos & Reitsma (1990).

STRs Localizados no Cromossomo Y

O cromossomo Y apresenta uma semelhança básica com o genoma mitocondrial: trata-se de uma molécula não recombinante, que se comporta como um único "grande *locus*" com exceção da pequena região pseudo-autossômica (PAR) que tem homologia com o cromossomo X. Dessa forma, a detecção de polimorfismos no cromossomo Y, ainda que espalhados pela sua extensão, pode permitir a construção de uma genealogia de genes e a formação de haplótipo.

O cromossomo Y, devido à diferença de tamanho apresenta um número maior de marcadores com relação ao DNAmt, que chega Ter um tamanho 4×10^4 vezes menor. Os polimorfismos do cromossomo Y são cada vez mais freqüentemente utilizados para esclarecer questões evolutivas e da estrutura genética das populações, e desde que foi demonstrado que os microssatélites do cromossomo Y têm similar grau de diversidade comparados com os encontrados nos cromossomos autossômicos (Roewer e cols. 1992). Cinco microssatélites

foram estudados, quatro tetranucleotídeos: DYS19, DYS390, DYS391 e DYS393, e um trinucleotídeo: DYS392 (Figura 2).

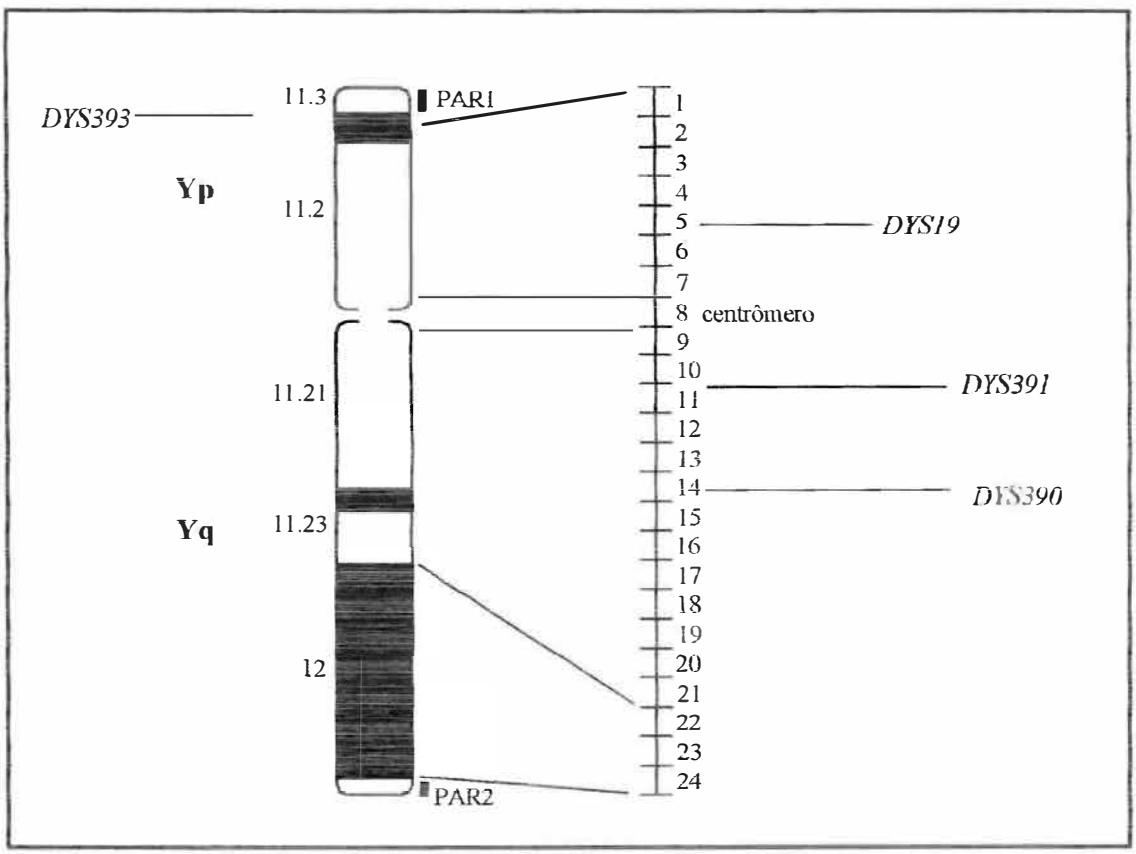


Figura 2: Mapa do cromossomo Y

DYS19: o primeiro dos microssatélites usados nos estudos do cromossomo Y humano (Roewer e cols. 1992). A seqüência está localizada no braço curto (Yp) sendo composta de unidades repetitivas de CTAT ou CTAC.

DYS390: estudos recentes mostraram que a região do *locus* é composta por duas regiões variáveis, CTGT e CTAT. As variações nas unidades de CTAT levam à formação da maioria dos alelos. Este *locus* está localizado no braço longo (Yq) do cromossomo Y.

DYS391: microssatélite tetranucleotídeo formado pelas unidades repetitivas CTAT, está localizado no braço longo do cromossomo Y (Yq11.21).

DYS392: microssatélite trinucleotídeo com variação no número de unidades da seqüência ATT. A localização do *locus* no cromossomo não foi determinada.

DYS393: formado pelas unidades repetitivas GATA, está localizado na região terminal não pseudoautossômica do braço curto do cromossomo Y.

AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR)

A PCR consiste na amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, explorando a capacidade de duplicação do DNA, visando a produção de milhões de cópias desta seqüência em microtubo de uma maneira simples e rápida.

Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, capaz de adicionar os oligonucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A polimerase do DNA requer, entretanto, um "ponto de início" ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibrida à fita molde simples, o qual é denominado de *primer*. Ambas as fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde de que se forneça *primers* específicos a cada uma delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que se hibridam especificamente às suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar (Gelfand, 1989; Newton, 1995).

A PCR foi realizada em volume final de 25μL, contendo 4μL de DNA genômico, 2,5μL de tampão (Tris/HCl 200mM, pH 8,5, KCl 500mM, $MgCl_2$ 20mM), 0,25μL de dNTP (dinucleotídeos tri-fosfato), primers de acordo com o sistema utilizado, 0,1μL de Taq polimerase e água deionizada e autoclavada q.s.p.

O controle negativo da reação é feito com o tubo *branco*, contendo todos os componentes da reação, e água deionizada e autoclavada substituindo o DNA genômico. O controle positivo é feito com o tubo *padrão*, contendo DNA de leitura padronizado no laboratório ((Pagotto e cols., 1999; Mendes Jr, 2001; Sousa, 2001). A este passo seguiu-se o programa correspondente ao sistema.

Todos os 10 sistemas analisados foram amplificados em um termociclador MJResearch. Os sistemas DYS19 e DYS392 foram amplificados com o mesmo programa (denominado DYS19), DYS390, DYS391 e DYS393 foram também amplificados com um mesmo programa (denominado DYS390). Para o vWF1, vWF2 e vWA foi determinado um programa especifico (VWF-TD) enquanto que para os sistemas HUMTPOX e HUMTH01 foram amplificados com o mesmo programa (denominado STR). As etapas de cada um estão descritas a seguir:

VWF-TD

Etapa 1 (1Ciclo): 94°C por 4 minutos;

Etapa 2 (16 Ciclos): 94°C por 1 minuto; 70°C por 1 minuto e 30 segundos, diminuindo 1°C por ciclo e 72 °C por 2 minutos;

Etapa 3 (28 Ciclos): 94°C por 1 minuto; 54°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 2 minutos;

Etapa 4 (1 Ciclo): Um ultimo ciclo de 72°C durante 10 minutos foi adicionado ao final do programa.

DYS19

Etapa 1 (1Ciclo): 94°C por 3 minutos;

Etapa 2 (5 Ciclos): 94°C por 30 segundos; 58°C por 1 minuto e 72°C por1 minuto;

Etapa 3 (30 Ciclos): 94°C por 30 segundos; 54°C por 1 minuto e 72°C por1 minuto;

Etapa 4 (1 Ciclo): 72°C por 10 minutos e 4°C indefinidamente.

DYS390

Etapa 1 (1Ciclo): 94°C por 3 minutos;

Etapa 2 (5 Ciclos): 94°C por 30 segundos; 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto;

Etapa 3 (30 Ciclos): 94°C por 30 segundos; 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto;

Etapa 4 (1 Ciclo): 72°C por 10 minutos e 4°C indefinidamente.

STR

Etapa 1: 1 minuto à 94°C

Etapa 2: 1 minuto à 61°C

Etapa 3: 1 minuto à 72°C

Estes três passos se repetem por 31 vezes e por fim um último passo de 10 minutos à 72°C e 4°C indefinidamente.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Após a obtenção do produto da PCR é preciso manipulá-lo um pouco mais, afim de determinar-se a tipagem de DNA de um indivíduo em determinado *locus*. Esta manipulação pode ser feita de diversas maneiras: fazendo-se a hibridação com sondas radioativas (Helmuth e cols., 1990), digerindo-se com enzimas de restrição (Schurr e cols., 1990), sequenciando-se as amostras (Vigilant e cols., 1989), dentre outras maneiras.

Neste trabalho, após o término da reação de PCR as amostras foram aplicadas em um gel vertical de poliacrilamida 12% para os sistemas vWF1, vWF2, vWA, TPOX e TH0, e 10% para os sistemas DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393, submetidos a uma voltagem constante e corados com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Sanguinetti e cols. (1994) com pequenas modificações, para visualização do produto amplificado, como descritas a seguir.

Os fragmentos amplificados foram analisados sob condições desnaturantes, necessitando, para isto, de um tratamento prévio com formamida antes de sua aplicação no gel. Desta forma, foram utilizados géis de

poliacrilamida com uréia (10% e 12%) e 2µl da amostra a ser analisada foram misturados a 8µl de *loading buffer* contendo formamida 75%, aquecidos à 94°C por 10 minutos e imediatamente após colocados em banho de gelo (tratamento desnaturante), seguindo-se a aplicação no gel.

Os géis desnaturantes 10 e 12% foram feitos diluindo-se a solução mãe de acrilamida (30%) para a concentração desejada (i.e., 6,66ml e 8,00ml respectivamente), TBE (Tris-Borato EDTA) 10X para TBE 1X (i.e., 2ml) e 9,6g de uréia em água destilada para o volume final de 20ml. À mistura de gel adicionou-se 300µL da solução saturada de persulfato de potássio e 15µL de TEMED® como catalisadores da reação de polimerização e imediatamente verteu-se a mesma em uma moldura de tamanho determinado previamente montado. Esta moldura era composta por duas placas de vidro e espaçadores presos com grampos de aço. Logo após verter-se o gel entre as placas colocou-se o "pente" de teflon na borda superior do gel, formando sulcos, onde posteriormente serão aplicadas as amostras de DNA amplificado e aguardou-se a polimerização por no mínimo 30 minutos.

O gel polimerizado foi montado em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE 10X em ambos pólos. Após a mistura com o corante (*Loading buffer*) e o tratamento desnaturante, as amostras foram aplicadas no gel com tamanho de 10cm, assim como os devidos padrões de migração, e o equipamento ligado à uma fonte e submetido a voltagem constante de 200V pelo tempo determinado para cada marcador. As condições específicas de cada *locus* são descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições específicas para eletroforese de cada *locus* polimórfico estudado.

Loci	Gel	Tempo
VWF1	12% desnaturante	4hs
VWF2	12% desnaturante	5hs
VWA	12% desnaturante	5hs
TPOX	12% desnaturante	5hs
THO	12% desnaturante	5hs
DYS19	10% desnaturante	3:30hs
DYS390	10% desnaturante	3:50hs
DYS391	10% desnaturante	5hs
DYS392	10% desnaturante	4:20hs
DYS393	10% desnaturante	3:40hs

COLORAÇÃO

A coloração com nitrato de prata (Sanguinetti e cols., 1994) e registro dos resultados foram feitos como descrito a seguir:

Fixação: terminada a eletroforese o gel foi colocado num recipiente de vidro tipo pirex contendo 100 mL de solução fixadora.

Impregnação com Nitrato de Prata: foram adicionados 2ml da solução de nitrato de prata (0,1g/mL), agitando-se por 05 minutos. Em seguida o gel foi lavado rapidamente 02 vezes em água destilada.

Revelação: foram adicionados 100 ml da solução reveladora mais 1 ml de formaldeído deixou-se agitando até a observação do aparecimento das bandas, quando o revelador foi desprezado e acrescentados 100 ml da solução fixadora.

Secagem do gel: depois de realizada a leitura do gel, este foi preparado para o processo de secagem em placas de vidro e papel celofane, à temperatura ambiente por 02-03 dias.

REAGENTES E SOLUÇÕES

Acrilamida + Bis-Acrilamida (29:1): 29 gramas de Acrilamida e 1 grama de bis-acrilamida diluídas em um volume final de 100 ml de água.

BIOTOOLS DNA Polymerase (1unit/µL), fornecida pelo BIOTOOLS, UNISCIENCE do Brasil.

dNTP 20mM: A solução de trabalho de dinucleotídeos tri-fosfato (dNTP) utilizada foi obtida diluindo-se a solução estoque (100mM) de dNTP (Pharmacia Biotech do Brasil Ltda e BIOTOOLS – B & M Labs, S.A) para uma concentração de 20 mM de cada dNTP.

Iniciadores específicos para os loci estudados (Bio-Synthesis) diluídos para 50 µM.

Iniciadores ou "primers" (solução de trabalho): Para a solução de trabalho os iniciadores foram diluídos a 2,55 µM.

Loading buffer: TBE 2X; xileno cianol 0,25%; azul de bromofenol 0,25%; EDTA 0,1M pH 8,0; ficoll 15%.

Nitrato de Prata: 0,15 g de $AgNO_3$ em 1-2 ml de H_2O milliQ.

Persulfato de Potássio: 650mg/6,5ml de água.

Proteinase K : 10mg/ml em água autoclavada.

Solução Fixadora: 50 ml de etanol contendo 2 ml de ácido acético, água milliQ qsp. 300 ml.

Solução Reveladora: 4,5 g de NaOH, 1ml formaldeído 37%, água milliQ qsp. 200ml.

Tampão BIOTOOLS: Tris/HCl 75mM pH 9.0; KCl 50mM; $MgCl_2$ 2mM; $(NH_4)2SO_4$ 20mM.

Tampão para lise de eritrócitos (Lise 1): Tris/HCl 0,01M pH 7,6; sacarose 0,32 M; $MgCl_2$ 5 mM; triton X-100 1%.

Tampão para lise de leucócitos (Lise 2): Tris/HCl 0,01M pH 8,5; KCl 50mM; $MgCl_2$, 5mM; NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%.

Tampão TBE (Tris-Borato EDTA) 10X: Tris/HCl 0,9M pH 8,0.

Tris -108g /53g ac bórico/ 40 ml edta 0,5M pH=8,0.

Tampão Tris-$MgCl_2$: Tris 0,1M, $MgCl_2$ 0,02M.

TEMED®.

IV - RESULTADOS

CONCENTRAÇÕES DE DNA

Após a extração de DNA, todas as amostras do nosso estudo, foram quantificadas pelo método fluorimétrico e calculadas suas concentrações. As amostras *pré e pós-transfusão* são referentes às amostras de sangue dos pacientes, sendo a concentração dada µg/mL de sangue total. A concentração da amostra *swab bucal*, também referente ao paciente, é dada em µg/mL de solução de DNA, já que o DNA extraído era proveniente de um raspado da cavidade oral utilizando um *swab* do tipo "escovinha". As concentrações das amostras das bolsas são dadas µg/mL de seu respectivo concentrado. As concentrações das amostras encontram-se nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: concentrações de DNA das amostras colhidas na sala de transfusão ambulatorial. Concentração média em µg/mL.

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (µg/mL)
PACIENTE 1		
Swab bucal		41
Pré-transfusão		315
Bolsa 1	CHL (240)	159
Bolsa 2	CHL (250)	198
Pós-transfusão		381
PACIENTE 2		
Swab bucal		48
Pré-transfusão		450
Bolsa 1	CHL (220)	159
Bolsa 2	CHL (230)	129
Bolsa 3	CHL (230)	216
Pós-transfusão		489
PACIENTE 3		
Swab bucal		61
Pré-transfusão		429
Bolsa 1	CHL (234)	132
Bolsa 2	CHL (240)	147
Pós-transfusão		366

Tabela 9 (Cont.)

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (µg/mL)
PACIENTE 4		
Swab bucal		51
Pré-transfusão		294
Bolsa 1	CHL (180)	192
Pós-transfusão		507
PACIENTE 5		
Swab bucal		39
Pré-transfusão		261
Bolsa 1	CHL (180)	132
Bolsa 2	CHL (280)	153
Bolsa 3	CHL (220)	150
Pós-transfusão		378
PACIENTE 6		
Swab bucal		47
Pré-transfusão		267
Bolsa 1	CHBL (196)	255
Bolsa 2	CHL (216)	147
Bolsa 3	CHL (206)	168
Pós-transfusão		303
PACIENTE 7		
Swab bucal		45
Pré-transfusão		135
Bolsa 1	CHIL (200)	234
Bolsa 2	CHIL (190)	264
Pós-transfusão		207
PACIENTE 8		
Swab bucal		48
Pré-transfusão		225
Bolsa 1	CHL (260)	183
Bolsa 2	CHL (240)	144
Pós-transfusão		354
PACIENTE 9		
Swab bucal		39
Pré-transfusão		141
Bolsa 1	CHIL (260)	135
Bolsa 2	CHIL (280)	162
Pós-transfusão		192

Tabela 9 (Cont.)

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (µg/mL)
PACIENTE 10		
Swab bucal		55
Pré-transfusão		369
Bolsa 1	CHL (260)	174
Bolsa 2	CHL (240)	141
Bolsa 3	CHL (156)	144
Pós-transfusão		276
PACIENTE 11		
Swab bucal		59
Pré-transfusão		93
Bolsa 1	CG (160)	1791
Pós-transfusão		120
PACIENTE 12		
Swab bucal		50
Pré-transfusão		492
Bolsa 1	CHIL (250)	141
Bolsa 2	CHIL (230)	108
Bolsa 3	CHIL (240)	120
Bolsa 4	CHIL (240)	138
Pós-transfusão		363
PACIENTE 13		
Swab bucal		46
Pré-transfusão		174
Bolsa 1	CP (180)	141
Bolsa 2	CHIL (250)	93
Pós-transfusão		138
PACIENTE 14		
Swab bucal		54
Pré-transfusão		219
Bolsa 1	CP (45)	132
Bolsa 2	CP (45)	114
Bolsa 3	CP (45)	186
Bolsa 4	CP (45)	129
Bolsa 5	CP (45)	180
Bolsa 6	CP (45)	186
Bolsa 7	CP (45)	105
Bolsa 8	CP (45)	111
Bolsa 9	CP (45)	138
Bolsa 10	CP (45)	156
Bolsa 11	CHIL (230)	105
Bolsa 12	CHIL (220)	129
Pós-transfusão		144

Tabela 9 (Cont.)

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (µg/mL)
PACIENTE 15		
Swab bucal		42
Bolsa 1 (1° dia)	CHL (200)	108
Bolsa 2 (1° dia)	CHL (100)	156
Pós-transfusão (1° dia)		312
Pré-transfusão (2° dia)		168
Bolsa 3	CHIL (330)	219
Bolsa 4	CHIL (320)	213
Bolsa 5	CHIL (330)	300
Bolsa 6	CHIL (310)	222
Pós-transfusão (2° dia)		171
Pré-transfusão (3° dia)		198
Bolsa 7	CHIL (230)	144
Bolsa 8	CHIL (220)	204
Pós-transfusão (3° dia)		303
PACIENTE 16		
Swab bucal		69
Pré-transfusão		141
Bolsa 1	CHL (290)	120
Bolsa 2	CHL (230)	243
Bolsa 3	CHL (280)	126
Bolsa 4	CP (45)	159
Bolsa 5	CP (45)	141
Bolsa 6	CP (45)	120
Bolsa 7	CP (45)	150
Bolsa 8	CP (45)	138
Bolsa 9	CP (45)	129
Bolsa 10	CP (45)	129
Pós-transfusão		102
PACIENTE 17		
Swab bucal		75
Pré-transfusão		162
Bolsa 1	CHIL (180)	165
Bolsa 2	CHIL (200)	135
Pós-transfusão		129
PACIENTE 18		
Swab bucal		56
Pré-transfusão		156
Bolsa 1	CHIL (230)	159
Bolsa 2	CHIL (120)	141
Bolsa 3	CHIL (260)	204
Pós-transfusão		120

Tabela 10: concentrações de DNA das amostras colhidas na sala de cirurgia. Concentração média em μg/mL.

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (μg/mL)
PACIENTE 19		
Swab bucal		52
Pré-transfusão		153
Bolsa 1	CHL (250)	171
Bolsa 2	CHL (350)	204
Bolsa 3	CHL (320)	177
Bolsa 4	CHL (350)	213
Pós-transfusão		216
PACIENTE 20		
Swab bucal		60
Pré-transfusão		297
Bolsa 1	CHL (400)	159
Bolsa 2	CHL (320)	192
Bolsa 3	CHL (310)	153
Pós-transfusão		255
PACIENTE 21		
Swab bucal		50
Pré-transfusão		411
Pós-transfusão		162
PACIENTE 22		
Swab bucal		49
Pré-transfusão		414
Bolsa 1	CHL (300)	132
Bolsa 2	CHL (310)	135
Bolsa 3	CHL (350)	120
Bolsa 4	CHL (360)	123
Bolsa 5	CHL (300)	144
Bolsa 6	CHL (370)	135
Pós-transfusão		168
PACIENTE 23		
Swab bucal		45
Pré-transfusão		252
Bolsa 1	CHL (320)	192
Pós-transfusão		336
PACIENTE 24		
Swab bucal		55
Pré-transfusão		204
Pós-transfusão		144

Tabela 10 (Cont.)

	Bolsa do hemocomponente (volume em mL)	Concentração (μg/mL)
PACIENTE 25		
Swab bucal		56
Pré-transfusão		174
Pós-transfusão		261
PACIENTE 26		
Swab bucal		54
Pré-transfusão		303
Bolsa 1	CHL (310)	141
Bolsa 2	CHL (310)	117
Bolsa 3	CHL (350)	132
Bolsa 4	CHL (320)	168
Pós-transfusão		141
PACIENTE 27		
Swab bucal		42
Pré-transfusão		159
Pós-transfusão		210
PACIENTE 28		
Swab bucal		46
Pré-transfusão		153
Bolsa 1	CHL (340)	207
Pós-transfusão		141
PACIENTE 29		
Swab bucal		49
Pré-transfusão		138
Bolsa 1	CHL (290)	111
Pós-transfusão		159
PACIENTE 30		
Swab bucal		45
Pré-transfusão		294
Pós-transfusão		300

COMPARAÇÕES ENTRE AS AMOSTRAS

Após realizadas as quantificações e calculadas as concentrações, as amostras das bolsas, *swab* bucal, pré e pós-transfusão foram comparadas entre os pacientes transfundidos e também com as amostras de sangue da rotina do laboratório (Tabela 11). As amostras "sangue rotina" são provenientes dos pacientes que procuraram o serviço de investigação de paternidade e foram quantificadas 30 amostras.

Foram comparadas também as amostras de sangue dos pacientes politansfundidos (sala de transfusão ambulatorial) com as amostras de sangue dos pacientes que não eram politransfundidos (cirugia), descrito na Tabela 12.

Tabela 11: Comparações entre as concentrações de DNA das amostras dos pacientes transfundidos, das bolsas de hemocomponente e sangue rotina. Concentrações em µg/mL.

Amostras	Menor concentração	Maior concentração	Média	Desvio padrão
Swab bucal	39	75	50,93	8,3
Pré-transfusão	93	492	248,1	109,9
Pós-transfusão	102	507	241,1	113,1
Bolsa CHL	108	243	156,91	31,78
Bolsa CHIL	93	300	169,77	54,91
Bolsa CP	105	186	141,33	24,37
Sangue rotina	108	414	266	84,46

Tabela 12: Comparações das concentrações de DNA das amostras dos pacientes politransfundidos com os pacientes da cirurgia. Concentrações em µg/mL.

Amostras - Pacientes	Menor concentração	Maior concentração	Média	Desvio Padrão
Swab bucal - Politransfundido	39	75	51,39	9,93
Swab bucal - Cirurgia	42	60	50,25	5,33
Pré-transf. - Politransfundido	93	492	249,50	119,71
Pré-transf. - Cirurgia	138	414	246,00	98.68
Pós-transf. - Politransfundido	102	507	263,33	133,76
Pós-transf. - Cirurgia	141	336	207,75	66,83

MISTURA DOS SANGUES E MISTURA DOS DNAs

STRs Autossômicos

As 3 misturas feitas entre dois sangues diferentes (Tabela 1), em diferentes proporções, variando a concentração de 5% do sangue B em relação ao sangue A, até chegar numa proporção de iguais concentrações (50%), foram testadas nos sistemas vWF1, vWF2, vWA, TH0 e TPOX. Foi encontrado, para todos os sistemas testados, um fraco sinal positivo de contaminação do sangue B em relação ao sangue A, a partir de uma concentração maior ou igual a 10%, como mostram as Figuras 3, 4, 5, 6 e 7. À medida em que a concentração do sangue B vai aumentando na mistura, o sinal da contaminação torna-se cada vez mais evidente, assim como é mostrado até o momento em que as concentrações se igualam (50%).

Quando foram usadas as soluções de DNA (Tabela 2), os resultados encontrados foram iguais aos obtidos na mistura de sangue, ou seja, a contaminação foi detectada a partir de uma concentração maior ou igual a 10%, como mostram as Figuras 8, 9 e 10.

Figura 3: mistura de sangues - sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A e B. Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

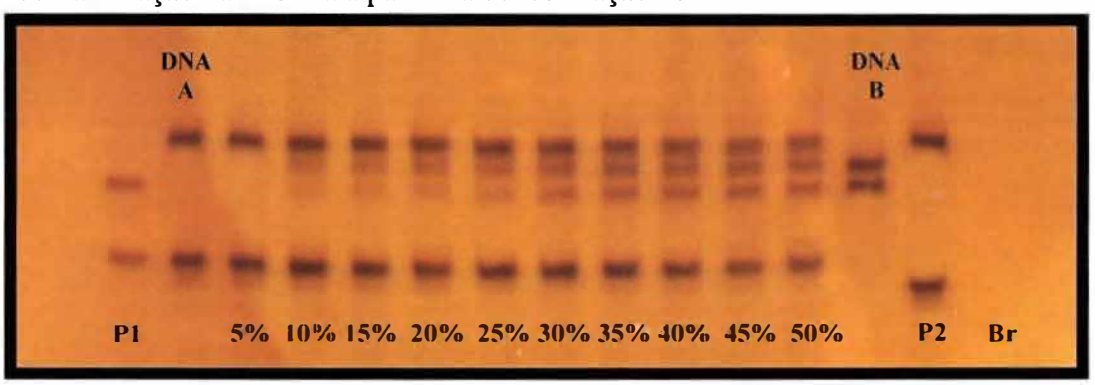


Figura 4: mistura de sangues - sistema vWF2, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A e B. Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

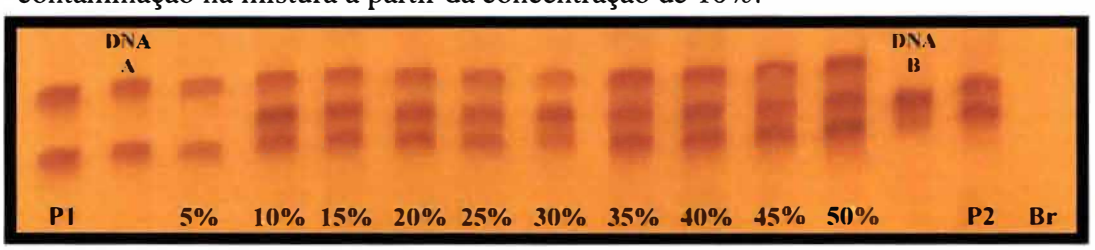


Figura 5: mistura de sangues - sistema vWA, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A e B. Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

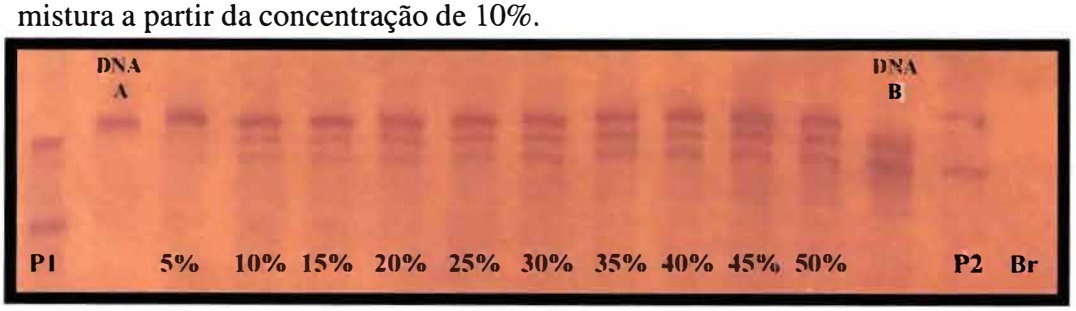


Figura 6: mistura de sangues - sistema TH0, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A e B. Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

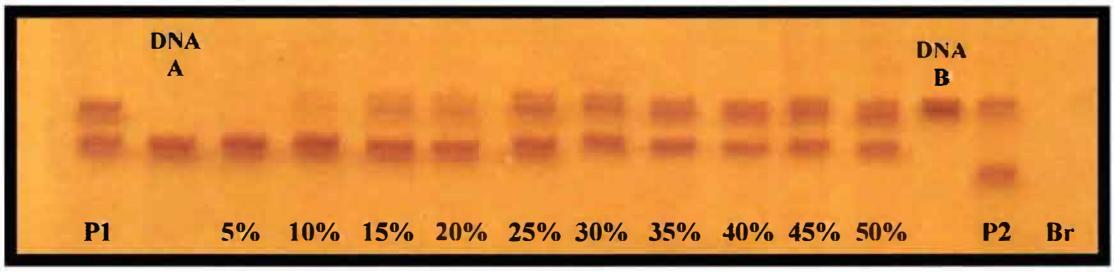


Figura 7: mistura de sangues - sistema TPOX, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A e B e a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

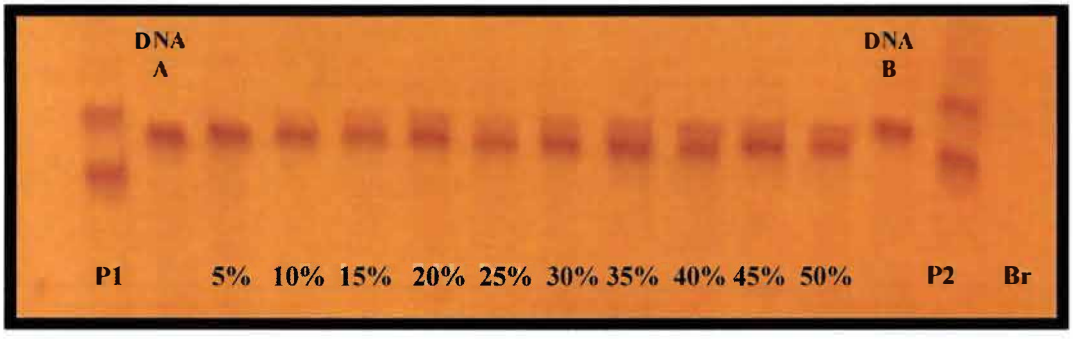


Figura 8: mistura de DNAs - sistema TPOX, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado e a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

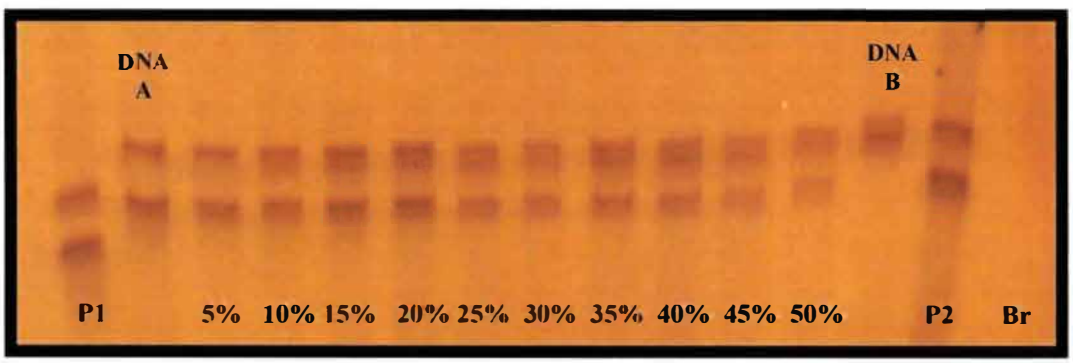


Figura 9: mistura de DNAs - sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado e a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.

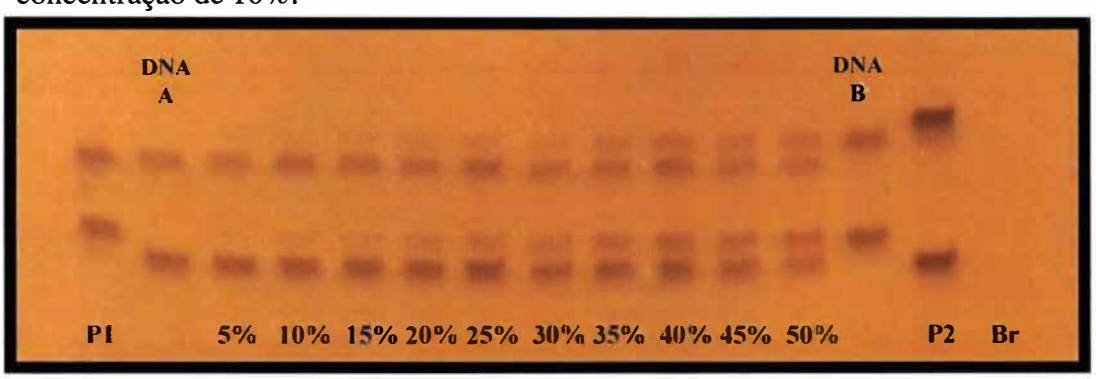
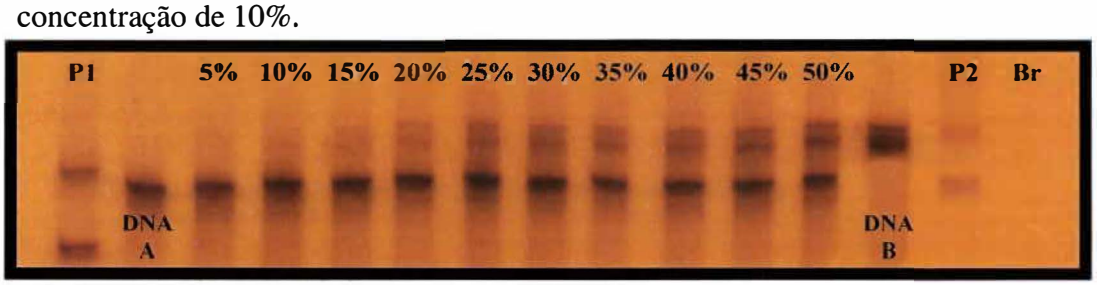


Figura 10: mistura de DNAs - sistema vWA, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado e a contaminação na mistura a partir da concentração de 10%.



STRs Y

A mistura de sangue realizada foi feita tomando-se o cuidado do sangue A pertencer à mulher e o sangue B pertencer ao homem. Quando foram utilizados os marcadores do tipo Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) para esta mistura variando a concentração de 5% do sangue B em relação ao sangue A, até chegar numa proporção de iguais concentrações (50%), foi encontrado, para todos os sistemas testados, um fraco sinal positivo de contaminação do sangue B em relação ao sangue A, a partir de uma concentração maior ou igual a 5%, como mostram as Figuras 11, 12 e 13.

Quando foram usadas as soluções de DNA, os resultados encontrados foram iguais aos obtidos na mistura de sangue, ou seja, a contaminação foi detectada a partir de uma concentração maior ou igual a 5%, como mostram as Figuras 14 e 15.

Figura 11: mistura de sangues - sistema DYS19, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A (mulher) e B (homem). Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 5%.

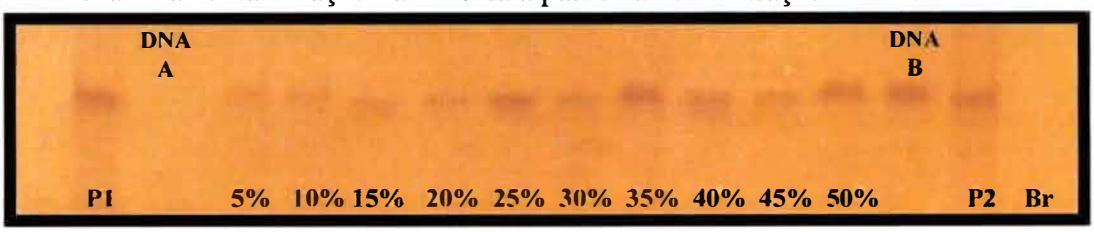


Figura 12: mistura de sangues - sistema DYS390, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A (mulher) e B (homem). Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 5%.

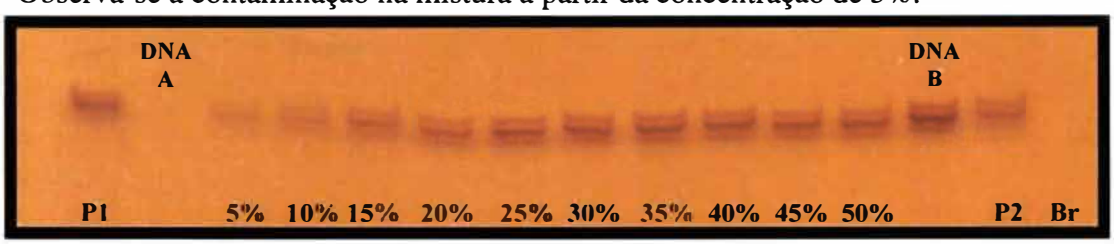


Figura 13: mistura de sangues - sistema DYS390, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A (mulher) e B (homem). Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 5%.

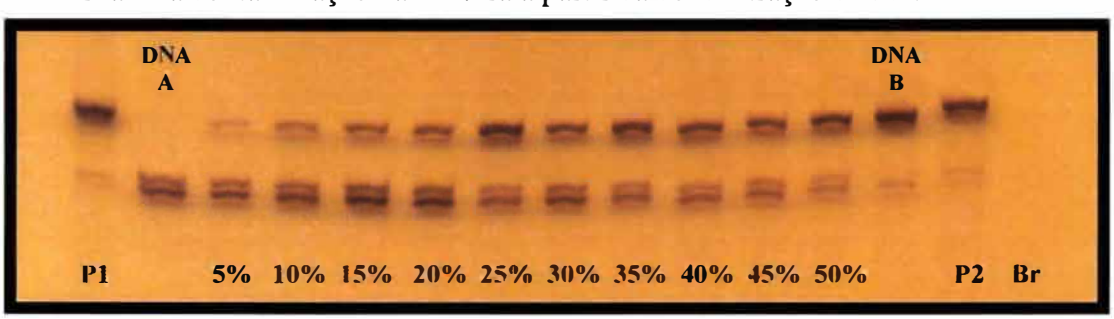


Figura 14: mistura de DNAs - sistema DYS392, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A (mulher) e B (homem). Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 5%.

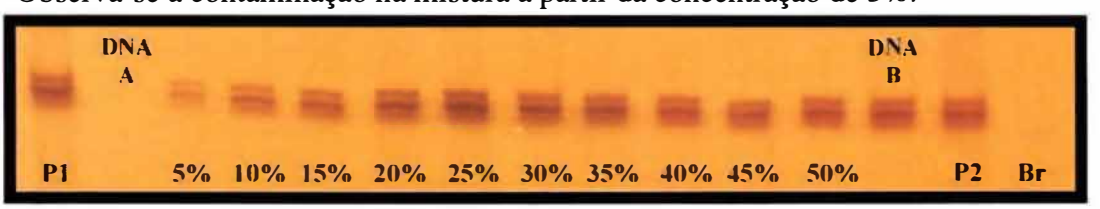
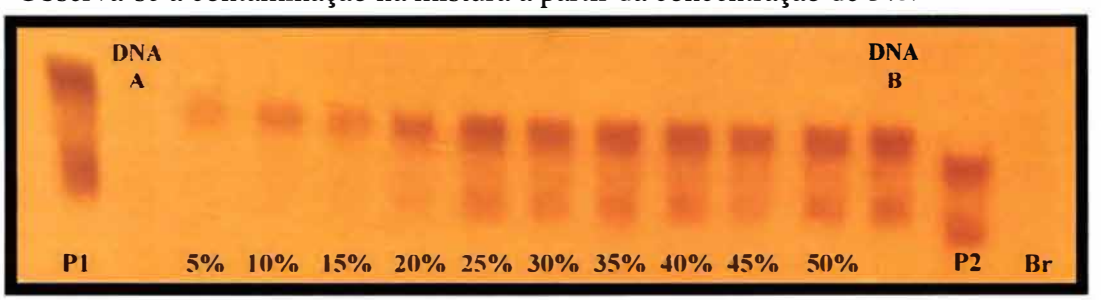


Figura 15: mistura de DNAs - sistema DYS393, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado no sangue A (mulher) e B (homem). Observa-se a contaminação na mistura a partir da concentração de 5%.



PACIENTES TRANSFUNDIDOS

Para todos os pacientes transfundidos, na sala de transfusão ou em cirurgia, que receberam concentrado de hemáceas, não foram observadas alterações na detecção de DNA comparando o sangue obtido antes da transfusão e trinta minutos pós-transfusão. Todas as amostras foram testadas nos cinco marcadores autossômicos (vWF1, vWF2, vWA, TH0 e TPOX), como mostram as Figuras 16, 17, 18, 19 e 20. O *swab* bucal foi usado como padrão para tipagem de DNA para os pacientes politransfundidos da sala de transfusão ambulatorial, e mesmo assim não houve diferença da tipagem de DNA extraído do *swab* bucal comparado com o DNA extraído do sangue periférico.

Um outro achado, mesmo sabendo que plaquetas não possuem núcleo, foi o fato de extrairmos DNA dos concentrados de plaquetas. As amostras foram testadas nos cinco marcadores autossômicos (figuras não mostradas) e mais uma vez não foram observadas alterações na detecção de DNA, comparando o sangue antes da transfusão e trinta minutos pós-transfusão, como mostra a Figura 21.

Figura 16: sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2 e 3) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 5.

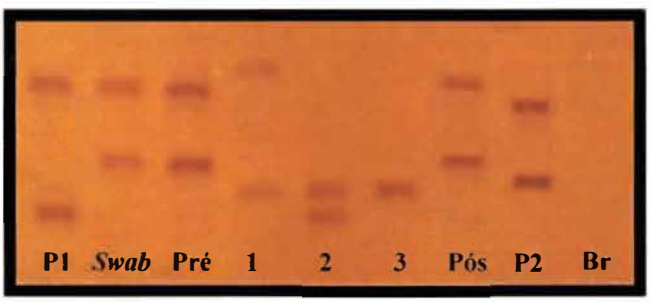


Figura 17: sistema vWA, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2 e 3) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 10.

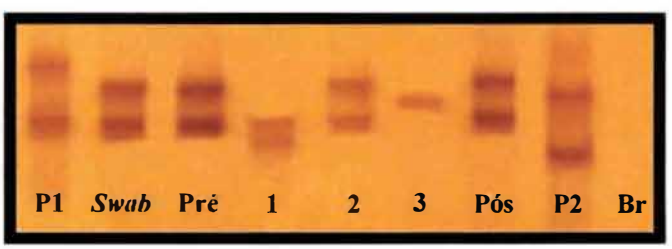


Figura 18: sistema TH0, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2, 3 e 4) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 12.

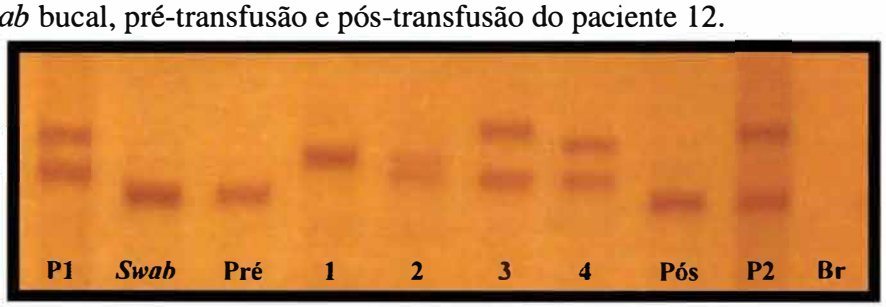


Figura 19: sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) recebidas durante 3 dias e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 15.

Figura 20: sistema TPOX, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2, 3 e 4) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do pac. 19.

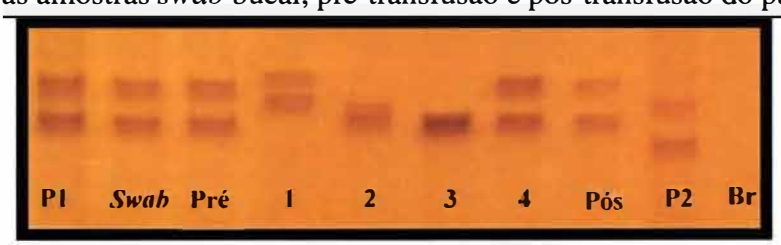
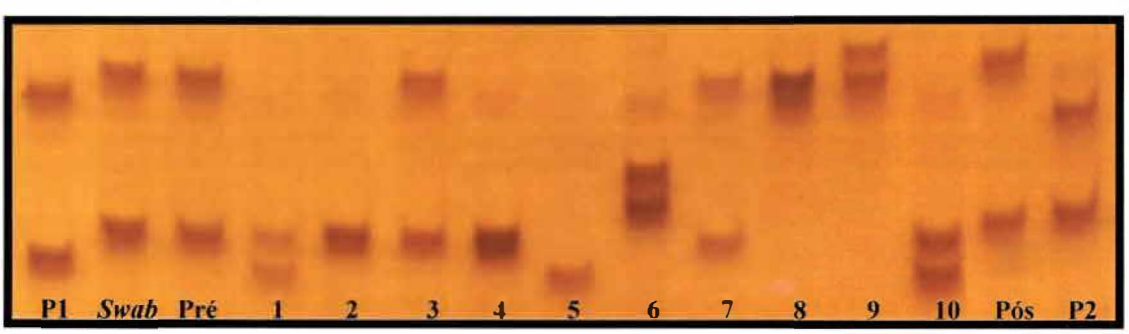


Figura 21: sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado nas bolsas de concentrado de plaquetas (1 à 10) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 16.



Em um único caso, em que o paciente, hospitalizado, recebeu uma bolsa de leucócitos, foram colhidas as amostras de rotina do nosso estudo (*swab* bucal, pré e pós-transfusão) e uma amostra pós-transfusão de vinte e quatro horas e estas amostras foram testadas nos cinco marcadores autossômicos. Neste caso, foi encontrada alteração da tipagem de DNA na corrente sangüínea após a transfusão, como mostram as Figuras 22, 23 e 24. Foi observado, para maior certeza, que quando comparados o DNA do *swab* bucal com o DNA do sangue pré-transfusão, não havia alterações. Os géis referentes aos sistemas vWF2 e TPOX não foram mostrados devido a amostra da bolsa do concentrado de leucócitos apresentar a mesma leitura das amostras do paciente.

Figura 22: sistema vWF1, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado na bolsa de concentrado de leucócitos (1) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão, pós-transfusão 30 minutos (Pós 1) e pós-transfusão 24 horas (Pós 2).

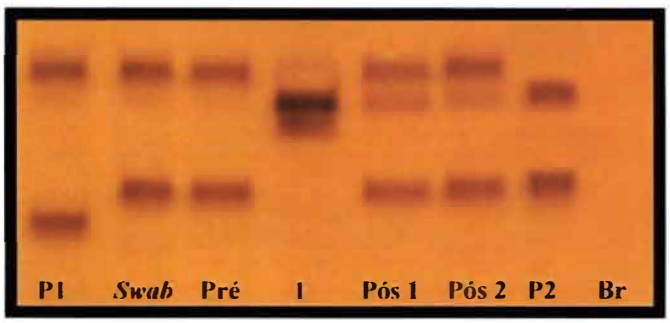


Figura 23: sistema vWA, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado na bolsa de concentrado de leucócitos (1) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão, pós-transfusão 30 minutos (Pós 1) e pós-transfusão 24 horas (Pós 2).

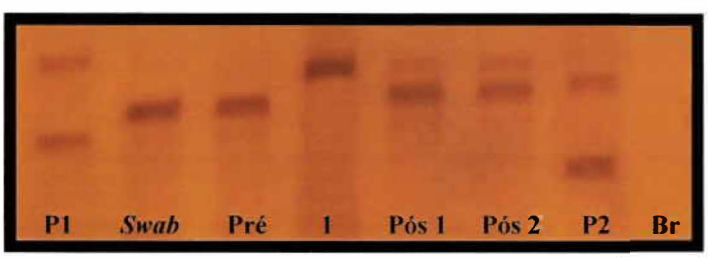
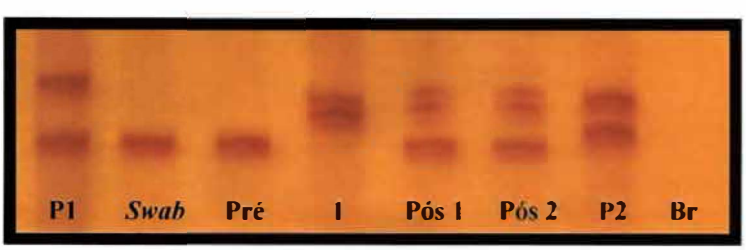


Figura 24: sistema TH0, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA encontrado na bolsa de concentrado de leucócitos (1) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão, pós-transfusão 30 minutos (Pós 1) e pós-transfusão 24 horas (Pós 2).



Um outro teste foi realizado para verificar a detecção de DNA masculino em mulheres receptoras de transfusões sangüíneas. Como não tínhamos acesso à relação dos dados referentes à identificação dos doadores, não sabíamos se as bolsas do hemocomponente eram provenientes de homens ou mulheres.

Analisamos, então, as amostras de sangue das bolsas do hemocomponente, que as mulheres receberam, com os marcadores DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 e verificamos entre as bolsas de sangue quantas eram de doadores homens.

A Tabela 13 mostra o número de bolsas de doadores homens que as mulheres receberam durante a transfusão.

Tabela 13: Relação do nº de bolsas recebidas / nº de bolsas de doadores homens.

Paciente	Total de bolsas recebidas	nº de bolsas de doadores homens
1	2	2
2	3	3
3	2	2
4	1	1
5	3	2
9	2	0
10	3	3
17	2	2
22	6	5
23	1	1
25	2	?
26	4	2
29	1	0
30	2	?

(?) Não foi possível colher as amostras das bolsas transfundidas.

Também foi feita a comparação do *swab* bucal com a amostra de sangue pré e pós-transfusão das mulheres que receberam transfusão na tentativa de se detectar o DNA masculino após a transfusão. Não foram observadas alterações na tipagem de DNA no sangue periférico como mostram as Figuras 25, 26, 27, 28 e 29.

Figura 25: sistema DYS19, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA masculino encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1,2 ,3, 4 e 6) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 22.

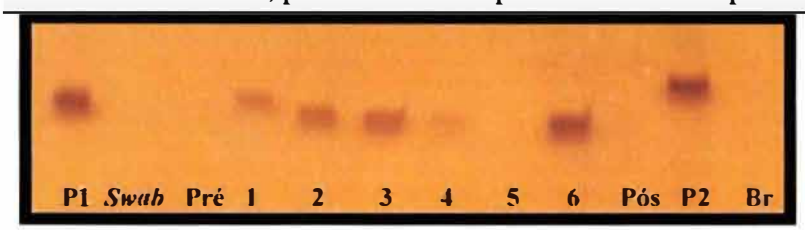


Figura 26: sistema DYS390, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA masculino encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1,2 ,3, 4 e 6) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 22.

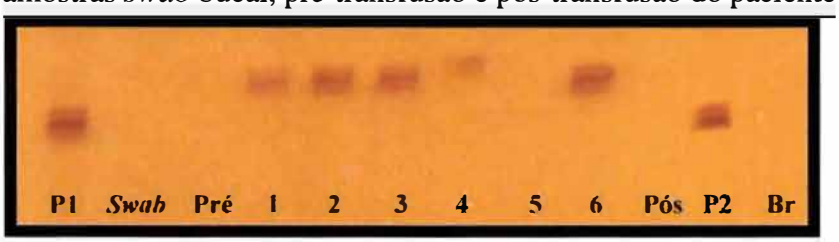


Figura 27: sistema DYS391, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA masculino encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2 e 3) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do paciente 10.

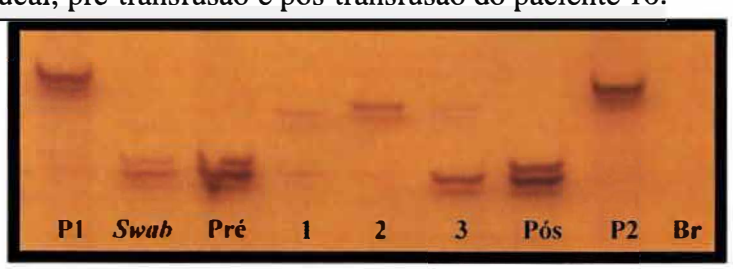


Figura 28: sistema DYS392, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA masculino encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2 ,3, 4 e 6) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do pac. 22.

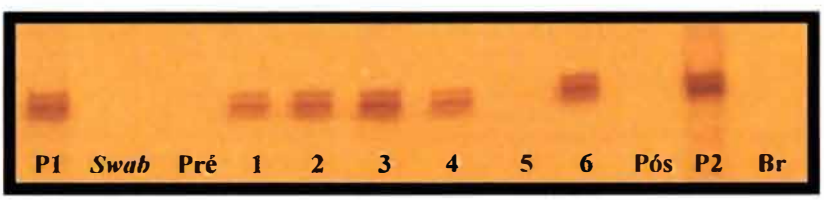
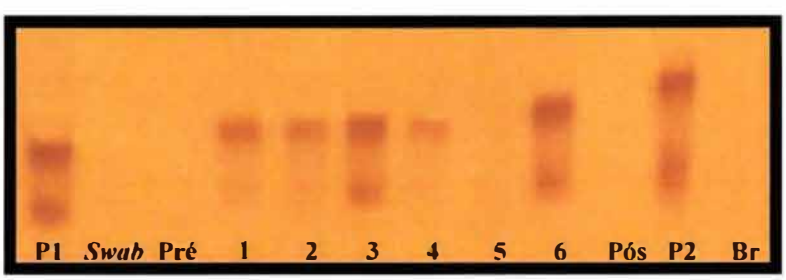


Figura 29: sistema DYS393, onde P1 e P2 são padrões de leitura, mostrando o DNA masculino encontrado nas bolsas de concentrado de hemáceas (1, 2 ,3, 4 e 6) e comparando as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão do pac. 22.



V - DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a aplicação da técnica de PCR utilizando marcadores moleculares do tipo STR (autossômicos e ligados ao cromossomo Y) para detectar a presença de DNA de um ou mais doadores em pacientes que receberam transfusão sangüínea. Também descreve a quantidade mínima de sangue ou DNA, em uma mistura, necessária para se detectar o DNA contaminante através da PCR e interferir no resultado de um possível teste de paternidade.

Na mistura dos sangues e dos DNAs realizada, variando a concentração do sangue contaminante de 5 à 50%, foi encontrado um sinal de contaminação a partir de uma concentração maior ou igual a 10% do sangue B em relação ao sangue A, quando utilizados os marcadores moleculares autossômicos (vWF1, vWF2, vWA, TH0 e TPOX).

Entretanto, na mesma mistura, quando foram utilizados os marcadores moleculares ligados ao cromossomo Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) a detecção do DNA contaminante (masculino) se deu a partir de uma concentração maior ou igual a 5%. Estes marcadores moleculares se mostraram mais sensíveis, devido a sua especificidade, para a amplificação pela técnica de PCR.

Os resultados encontrados mostraram que para detectar o microquimerismo em pacientes que receberam transfusão sangüínea é necessário que o paciente tenha recebido uma unidade de concentrado de hemáceas ou plaquetas contendo volume maior ou igual a 10% da sua volemia. Portanto, o microquimerismo não foi encontrado em nenhum paciente transfundido, pois em nosso estudo não houve nenhum paciente que tivesse recebido este volume em uma transfusão.

As amostras de sangue das mulheres que receberam transfusão de doadores homens foram testadas com marcadores do tipo Y, na tentativa de detectar o DNA masculino circulando na sua corrente sangüínea. Não foram

encontradas alterações na tipagem de DNA, apesar de terem recebido transfusão em quantidade superior a 5% da volemia que, tendo em vista os resultados laboratoriais, deveria ser suficiente para ser detectado pela PCR.

Adams e cols. (1992), detectaram a seqüência de gene do cromossomo Y em mulheres receptoras de múltiplas transfusões durante cirurgias cardíacas. Estas mulheres receberam de 2 até 25 unidades de concentrado de hemáceas e de 1 até 87 unidades de concentrado de plaquetas. Utilizando a chamada *Nested* PCR notaram positividade, em média, 2 dias após as transfusões (variando de 1 até 6 dias de sinal positivo). Estes autores estabeleceram a sensibilidade de seu método através da diluição seriada de DNA masculino em DNA feminino e citaram a capacidade deste método de identificar 1 célula masculina entre 10.000 células femininas.

Em 1998, Sahota e cols. compararam os diversos métodos de biologia molecular para estudo de microquimerismos. A sensibilidade de 7 métodos diferentes foi comparada e o método mais sensível foi o *Nested* PCR para detectar seqüências do cromossomo Y.

Lee e cols. (1999), acompanharam o microquimerismo pós-transfusional em pacientes do sexo feminino transfundidas em cirurgias eletivas, utilizando marcadores Y, e foram capazes de detectar entre 1 a 5 células masculinas em 125μL de sangue total das pacientes transfundidas. Estas pacientes receberam em média 2 unidades de sangue de doadores do sexo masculino. O microquimerismo foi detectado entre o terceiro e quinto dia o que representava uma população de 10^3 células masculinas por 125μL e entre 7 a 14 dias não havia mais sinal positivo. Esta equipe de pesquisadores foi capaz de obter uma sensibilidade em torno de 1 célula masculina entre 100.000 à 1.000.000 de células femininas.

Nesse mesmo trabalho, um outro grupo de mulheres analisadas que receberam no mínimo 4 unidades de sangue de doadores masculinos e o máximo de 18 unidades, apresentaram microquimerismo de 4 meses até um ano e meio após as transfusões. Os autores atribuíram este persistente microquimerismo ao papel imunosupressivo utilizado antes das transfusões permitindo uma facilidade do implante de células tronco do doador no receptor.

Outro fator em nosso trabalho foi o tempo de estocagem das bolsas de sangue e a viabilidade dos leucócitos. Embora não tendo as informações em relação ao tempo de estocagem das unidades transfundidas, as concentrações médias de DNA encontradas nas bolsas de hemáceas e plaquetas apresentaram-se equivalentes.

Comparando-se as médias das amostras pré-transfusão X pós-transfusão dos 30 pacientes transfundidos (Tabela 11) não houve diferença significativa, as médias pré e pós-transfusão foram consideradas equivalentes (p=0,71). Também não houveram diferenças significativas quando comparadas as amostras pré-transfusão X sangue rotina (p=0,48) e pós-transfusão X sangue rotina (p=0,34).

Entretanto, a comparação feita entre as diversas bolsas e sangue rotina (CHL X CHIL X CP X sangue rotina) mostrou diferença significativa (p<0,001), portanto as médias não foram equivalentes entre si. Para descobrirmos quais foram as diferenças significativas encontradas foi realizado o teste *post hoc* de Tukey que indicou: sangue rotina>(CHL=CHIL=CP). Logo, a média da amostra sangue rotina é significativamente superior às médias das bolsas, que se equivalem entre si.

A comparação entre pacientes politransfundidos X pacientes cirurgia para as amostras *swab* bucal, pré-transfusão e pós-transfusão (Tabela 12), notou-se o seguinte:

- *swab* bucal - politransfundido X *swab* bucal - cirurgia: p=0,69. Não houve diferença significativa, as médias podem ser consideradas equivalentes.
- pré-transfusão - politransfundido X pré-transfusão - cirurgia: p=0,93. Não houve diferença significativa, as médias podem ser consideradas equivalentes.
- pós-transfusão - politransfundido X pós-transfusão - cirurgia: p=0,14. Não houve diferença significativa, as médias podem ser consideradas equivalentes.

Apenas um dos trinta pacientes estudados, ou seja aquele que recebeu uma única bolsa de concentrado de leucócitos, foi observado alteração na tipagem de DNA na corrente sangüínea, mesmo o volume da bolsa sendo menor do que

10% da volemia do paciente, logo após trinta minutos do término da transfusão. Em uma outra coleta feita após 24h o sinal de contaminação persistia. Essa contaminação se deve ao fato da alta concentração de DNA encontrada na bolsa de leucócitos.

VI - CONCLUSÕES

A metodologia descrita neste trabalho, utilizando STRs autossômicos e a mistura feita entre os sangues e entre as soluções de DNA para saber a quantidade mínima necessária para se detectar o DNA contaminante através da PCR, não foi encontrada na literatura.

É possível fazer a identificação genética em uma mistura de DNA desde que comparadas as amostras do *swab* bucal com as amostras de sangue pré e pós transfusão. O *swab* bucal mostrou-se de grande valia tendo a função de um parâmetro para as comparações de tipagens de DNA feitas entre as amostras pré e pós-transfusão dos pacientes politransfundidos.

A quantidade mínima de sangue ou DNA, em uma mistura, necessária para se detectar o DNA contaminante pela PCR e interferir no resultado do teste de paternidade, corresponde à 10% da volemia do paciente quando utilizamos os marcadores moleculares autossômicos vWF1, vWF2, vWA, TH0 e TPOX. Quando utilizamos os marcadores moleculares ligados ao cromossomo Y (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) os testes mostraram que seria necessário um volume de sangue maior ou igual a 5% da volemia do paciente.

Extraindo o DNA das amostras de sangue dos pacientes transfundidos não detectamos o DNA contaminante (do doador), quando utilizamos os marcadores autossômicos, sendo que em nosso estudo não houve nenhum paciente que recebesse tal volume. Para a detecção de DNA masculino em mulheres receptoras de transfusão sangüínea de doadores homens, utilizando os marcadores ligados ao cromossomo Y, mesmo as pacientes recebendo um volume maior ou igual a 5% da sua volemia, não detectamos a contaminação.

Observamos que a alta concentração de DNA encontrada na bolsa de leucócitos é capaz de interferir nos testes de paternidade e identificação genética logo após a transfusão, independente do volume. Entretanto, é baixa a freqüência deste tipo de transfusão, necessitando o paciente de cuidados especiais para o procedimento.

Quando comparadas as concentrações de DNA nas unidades de concentrado de hemáceas lavadas (CHL), lavadas e irradiadas (CHIL) e plaquetas (CP) não houve diferenças significativas nas médias das concentrações. Embora exista o cuidado de separar os leucócitos dos demais hemocomponentes, no momento do fracionamento do sangue, nossos testes mostram que este fracionamento ainda não é totalmente eficaz.

Os resultados demostraram que a contaminação por transfusão de concentrados de hemáceas e plaquetas não é capaz de mascarar os resultados nos possíveis testes para a ivenstigação de paternidade, resultando desnecessárias as preocupações tão comuns quanto à possibilidade de falseamento de resultados no suposto pai pela transfusão sangüínea. Pelas próprias condições das transfusões realizadas, muito raramente alguém é submetido a troca total de seu sangue e, consequentemente, é impossível esperar que o DNA do receptor desapareça das análises.

Este trabalho mostrou que a transfusão de concentrado de hemáceas, plaquetas e plasma fresco não interfere nos testes de paternidade e na identificação genética, quando utilizadas as técnicas de rotina de PCR para a detecção de um único VNTR do tipo STR com a metodologia descrita usada no laboratório.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DH, Hutchinson IV (1997). Microchimerism and graft tolerance: cause or effect? *Lancet* 349: 1336-7.

Adams PT, Davenport RD, Reardon DA, Roth MS (1992). Detection of circulating donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 80(2): 551-555.

Adamson D, Alberstsen H, Bradley P, Carlson M, Cartwrigtht P and cols (1995) A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. *Am J Hum Genet* 57: 619-628.

Allen M, Engströn AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Pääbo S, Gyllensten U (1998). Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on Robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 43(3): 453-64.

American Association of Blood Banks. Technical Manual. 13 ed. Bethesa: AABB, 1999.

Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H (1992). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) *locus*. *Hum Mol Genet* 1(2): 137.

Aractingi S, Uzan S, Dausset J, Carosella ED (2000). Microchimerism in human diseases. *Trends Immunol Today* 21(3): 116-8.

Arpini-Sampaio Z, Costa MC, Melo AA, Carvalho MF, Deus MS, Simões AL (1999). Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. *Hum Biol* 71: 69-85.

Bell GI, Rutter WJ (1982). The highly polymorfic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 295: 31-35.

Bostock-Smith CE, Laughton CA, Searle MS (1998). DNA minor groove recognition by a tetrahydropyrimidinium analogue of hoechst 33258: NMR

and molecular dynamics studies of the complex with d(GGTAATTACC)2 *Nucleic Acids Res* 126(7): 1660-7.

Casaña P, Martinez F, Aznar JA (1995a). Instability of a variable number tandem repeat in intron 40 of the human von Willebrand Factor Gene. *Brit J Haemat* 91: 253-258.

Casaña P, Martinez F, Aznar JA, Lorenzo JI, Jorquera JI (1995b). Practical application of three polymorphic microsatellites in intron 40 of the von Willebrand factor gene. *Haemostasis* 25: 264-271.

Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ (1997). Comparasion od three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci* 42(6): 1126-35.

Chakraborty R, Kidd KK (1991). The utility of DNA typing in forensic work. *Science* 254: 1735-39.

Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B (1999). The utility of short tandem repeat *loci* beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Source Electrophoresis* 20(8): 1682-96.

Cumming AM, Armstrong JG, Pendry K, Burn AM, Wensley RT (1992). Polymerase chain reaction amplification of two polymorphic simple repeat sequences within the von Willebrand factor gene: application to family studies in von Willebrand disease. *Hum Genetics* 89: 194-198.

Dimo-Simonin N, Grange F, Brandt-Casadevall C (1997). PCR-Based forensic testing of DNA from stained Cytulogical Smears. *J Forensic Sci* 42(3): 506-509.

Edwards A, Civitello A, Hammond HÁ, Caskey CT (1991a). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49: 746-756.

Edwards MC, Clemens PR, Tristan M, Pizzuti A, Gibbs RA (1991b).

Pentanucleotide repeat lenght polymorphism at the human CD4 *locus*. *Nucleic Acids Res* 19: 4791.

Elwood ET, Larsen CP, Maurer DH, Routenberg KL, Neylan JF, Wheichel JD (1997). Microquimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet* 349(10): 1358-60.

Evans PC, Lambert N, Furst DE, Moore JM, Nelson JL (1999). Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 93(6): 2033-2037.

Farah SB. *DNA: segredos e mistérios* 1ª ed., Campinas Xavier, 1997.

Fontes P, Rao AS, Demetris AJ (1994). Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet* 344: 151-55.

França GV. *Medicina Legal* 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan (2001).

Frau S, Bernadou J, Meunier B (1997). Nuclease activity and binding characteristics of a cationic "manganese porphyrin-bis(benzimidazole) dye (Hoechst 33258)" conjugate. *Bioconjug Chem* 8(2):222-31.

Gelfand D. Taq DNA polymerase In: Erlich HA. *PCR Technology: principles and applications for DNA amplification* USA e Canadá Stockton Press (1989) cap 2 p 17-22.

Gill P, Evett I (1995). Population genetics of tandem repeat (STR) *loci Genética* 96: 69-87.

Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt AS, Orkin SH (1985). Human von Willebrand factor (vWf): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228:1401-1406.

Haddad AP, Sparrow RL (1997). Two novel alleles of the ATCT variable number tandem repeat *locus* VWFVNTR I inintron 40 of the von Willebrand factor gene. *British J Haem* 96: 298-300.

Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R e cols. (1990). HLA-DQ alpha allele and genotype frequencies in various human populations , determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet* 47(3): 515-523.

Higuchi R (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR *In:* Erlich HA (Ed) *PCR technology - principles and aplications for DNA amplification pp 36 New York: Stockton Press.*

Ishida H, Kawai T, Tanabe K (1996). Status of microquimerism in recipients 15 years after living related kidney transplantation. *Transplantation* 62: 126-28.

Jackson JB (1990). The polymerase chain reaction in transfusion medicine. *Transfusion* 30(1): 51-7

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985). Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316(4): 76-79.

Jorde LB, Bamshad MJ, Watkins WS, Zenger R, Fraley AE e cols. (1995). Origins and affinities of modern humans: a comparison of mitochondrial and nuclear genetic data. *Am J Hum Genet* 57: 523-538.

Kasai K, Nakamura Y, White R (1990). Amplification of a Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) *Locus* (pMCT118) by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Its Aplication to forensic Science. *J Foren Sci* 35: 1196-1200.

Kayser M, Knijff P, de Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M e cols. (1997). Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping *Eletrophoresis* 18: 1602-1607.

Kidd JR, Black FL, Weiss KM, Balazs I, Kidd KK (1991). Studies of three amerindian populations using nuclear DNA polymorphisms. *Human Biology* 63: 775-94.

Kimpton C, Walton A, Gill P (1992). A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Genet* 1: 287.

Lawler M, MacCann SR, Conneally E, Humphries P (1989). Chimerism following allogeneic bone marrow transplantation: detection of residual host cells using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 73: 205.

Lee HC, Ladd C, Scherczinger CA, Bourke MT (1997). Forensic applications of DNA typing: part 2: collection and preservation of DNA evidence. *Am J Forensic Med Pathol* 19(1): 10-8.

Lee TH, Paglieroni T, Ohto H, Holland PV, Busch MP (1999). Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microqimerism in severe trauma patients. *Blood* 93(9): 3127-39.

Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Taylor JA, Bacher JW e cols. (1998). Development and population study of na eight-*locus* short tandem repeats (STR) multiplex system. *J Forensic Sci* 43(6): 1168-80.

Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW (1996). Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat *loci*-silver stain and fluorescence detection. *Biotech* 20(5): 882-889.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485-7.

Lo YM, Lo ES, Watson N (1996). Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 88: 4390-5.

Lo YM, Noakes L, Roux E (1995). Application of a polymorphic Y mocrossatelite to the detection of post bone marrow transplantation chimerism. *Br J Haematol* 89: 645-9.

Loontiens FG, McLaughlin LW, Diekmann S, Clegg RM (1991). Binding of Hoechst 33258 and 4', 6-diamidino-2-phenylindole to self-complementary decadeoxynucleotides with modified exocyclic base substituents. *Biochemistry* 30: 182-189.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM e cols. (1991). Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase Chain Reaction. *Biochemistry* 30:253-269.

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worral NK, Shelton-Inloes BB e cols. (1989). Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 264:19514-19527.

McDaniel DO, Naftilan J Hulvey K (1994). Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with donor bone marrow. *Transplantation* 57: 852-6.

Mendes Jr CT (2001). Freqüências alélicas de polimorfismo de DNA do tipo STR em indígenas da Amazônia Brasileira. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Murray JC, Buetow KA, Weber JL, Ludwigsen S, Sherpbier-Heddema T e cols. (1994). A comprehensive human linkage map with centmorgan density: Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265: 2049.

Nagai A, Yamada S, Watanabe Y, Bunai Y, Ohya I (1996). Analysis of the STR *loci* HUMF13A01, HUMFXIIIB, HUMLIPOL, HUMTH01, HUMTPOX and HUMVWFA31 in a Japanese population. *International J Legal Medicine* 109: 34-36.

Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T e cols. (1987). Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.

Nelson JL (1998). Microchimerism and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol* 10:564-71.

Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC e cols. (1998). Microchimerism and HLA-comatible relationsships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351(21): 559-62.

Newton CR. PCR1ª ed Oxford BIOS Scientific Publishers Ltd (1995).

Pagotto RC, Canas MC, Brito RO, Simoes AL (1999). Allele frequencies of three STRs of the human von Willebrand factor gene (vWF) in a Brazilian population sample. *Int J Legal Med* 112: 326-328.

Parsons TJ, Weedn VW. Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples In: Haglund WD, Sorg MH. *Forensic Taphonomy: the postmortem fate of human remains* CRC Press Inc Boca Raton Florida USA 1997 cap 7 p 109-126

Peake IR, Bowen DJ, Bignell P, Lidell MB, Sadler JE e cols. (1990). Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand's disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. *Blood* 76: 555-561.

Pena SDJ (1997). O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade *Bioética* 5(2): 231-241.

Pena SDJ, De Souza KT, De Andrade M, Chakraborty R (1994). Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 723-727.

Pestoni C, Lareu MV, Rodriguez MS, Munhoz I, Barros F, Carracedo A (1995). The use of the STRs HUMTH01 HUMVWA31/A HUMF13A1 HUMFES/FPS HUMLPL in forensic application: validation studies and population data for Galicia (NW Spain). *International J Legal Medicine* 107: 283-290.

Ploos van Amstel HK, Reitsma PH (1990). Tetranucleotide repeat polymorphisms in the vWF gene. *Nucleic Acids Research* 18: 4957.

Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merril CR (1991a). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human c-fes/fps proto-oncogene (FES). *Nucleic Acids Res* 19: 4018.

Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merril CR (1991b). Tetranucleotide

repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucleic Acids Res* 19: 4036.

Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merril CR (1991c). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res* 19: 3753.

Prado VF, Castro AK, Oliveira CL, Souza KT, Pena SD (1997). Extraction of DNA from human skeletal remains pratical applications in forensic sciences *Genet Anal* 14(2): 41-4.

Reed W, Lee TH, Vichinsky EP, Lubin BH, Busch MP (1998). Sample suitability for the detection of minor white cell populations (microchimerism) by polymerase chain reaction. *Transfusion* 38: 1041-45.

Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V (2000). DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 40: 48-53.

Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Epplen JT (1992). Simple repeat sequences on the human Y cromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 89: 389-394.

Rolles K, Burroughs AK, Davidson BR, Karatapanis S, Prentice HG, Hamon MD (1994). Donor-especific bone marrow infusion after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 343: 263-65.

Sadler JE (1994). A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71: 520-525.

Sahota A, Yang M, McDaniel HB e cols. (1998). Evolution of seven PCR-based assays for the analysis of microchimerism. *Clin. Biochem.* 31(8): 641-5.

Sanguinetti C, Dias Neto E, Simpson AJG (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques* 17(5): 209-214.

Schechter GP, Whang-Peng J, McFarland W (1997). Circulation of donor lymphocytes following blood transfusion in man. *Blood* 49: 651-6.

Schneider PM (1997). Basic issues in forensic DNA typing. *Forensic Scince International* 88: 17-22.

Schumm JW (1996). Genetic identity new aproaches to DNA fingerprint analysis. *Promega Notes* 58: 12-20.

Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA e cols. (1990). Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46(3): 613-623.

Shapiro ED, Reifler S (1996). Forensic DNA analysis and the United States Government. *Med Sci Law* 36: 43-51.

Silva-Jr WA, Bortolini MC, Meyer D, Salzano FM, Elion J e cols. (1999). Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable *loci*. *Americ J Phys Anthropol* 109: 425-437.

Sousa SMB (2001). Estrutura genética de uma comunidade Afro-Brasileira; São Gonçalo-Bahia. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW (1996). A general approach to analysis of plymorfic short tandem repeat *loci*. *Biotech* 20(2): 266-276.

Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M (1993). Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 17: 1127-52.

Sweet D, Lorente M, Lorente JÁ, Valenzuela A, Villanueva E (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci* 42(2): 320-322.

Thomson JA, Pilotti V, Stevens P, Ayres KL, Debenham PG (1999). Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. *Forensic Sci Int* 100(1-2): 1-16.

Triulzi JD, Nalesnik MA (2001). Microchimerism , GVHD, and tolerance in solid organ transplantation. *Transfusion* 41: 419-26.

Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P (1994). Variation in short tandem repeat sequences a survey of twelve microssatellite *loci* for use as forensic identification markes. *Int J Legal Med* 107(1): 13-20.

van Huffel V, Rouger P (1999). DNA polymorphism applied to paternity testing Analysis of 877 cases. *Transfus Clin Biol* 6(4): 236-44.

Verweij CL, de Vries CJM, Distel B, van Zonneveld A, van Kesses AG e cols. (1985). Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acid Research* 13: 4699-4717.

Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23): 9350-54.

Wall WJ, Williamson R, Petrou M, Papaiannou D, Parkin BH (1993). Variation of short tandem repeats within and between populations. *Hum Mol Genet* 2(7): 1023-1029.

Wyman RA, White R (1980). A highly *locus* in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(11): 6754-58.

Zhang JG, Lin F, Chase A, Goldman JM, Cross NC (1996). Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87(6): 2588-93.