



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



KEYLA PATRÍCIA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA ENXERTIA EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TCTH ALOGÊNICO
A PARTIR DA ANÁLISE DE CARTÕES FTA® E DESENVOLVIMENTO DE
FERRAMENTA COMPUTACIONAL**

Recife
2021

KEYLA PATRÍCIA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA ENXERTIA EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TCTH ALOGÊNICO
A PARTIR DA ANÁLISE DE CARTÕES FTA E DESENVOLVIMENTO DE
FERRAMENTA COMPUTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia e
Bioinformática

Orientador: Valdir Queiroz Balbino

Coorientadora: Natália Cybelle Lima Oliveira

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Oliveira, Keyla Patrícia de

Análise da enxertia em pacientes submetidos ao TCTH alogênico a partir da análise de cartões FTA® e desenvolvimento de ferramenta computacional / Keyla Patrícia de Oliveira– 2021.

55 f.: il., fig., tab.

Orientador: Valdir Queiroz Balbino

Coorientadora: Natália Cybelle Lima Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Células-tronco 2. Medula óssea 3. Biologia computacional I. Balbino, Valdir Queiroz (orient.) II. Oliveira, Natália Cybelle Lima (coorient.) III. Título

616.02774

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-352

**ANÁLISE DA ENXERTIA EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TCTH
ALOGÊNICO A PARTIR DA ANÁLISE DE CARTÕES FTA® E
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTA COMPUTACIONAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, Área de
concentração Biotecnologia, pela
mestranda Keyla Patrícia de
Oliveira, como requisito para
obtenção do título de mestre em
Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rodrigo Moura Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Cristiane Moutinho de Lagos Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Marcos da Regueira Silveira Neto
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma e a todos aqueles que foram voluntários para que este estudo pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho. Houve momentos em que só pensei em sentar, chorar e desistir.

Ao meu gerente e amigo Carlos Souza, por todo apoio, ajuda e incentivo. Foi, com certeza, àquele que me fez dar o primeiro passo da caminhada da minha Dissertação.

Aos meus orientadores Valdir Balbino e Natália Oliveira, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

Às enfermeiras Andréa Maria dos Santos e Wanessa Gomes dos Santos e à assistente social Izabelle Dayane Ramos de Magalhães, todas integrantes do Programa de Transplante de Medula Óssea do Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco, pela ajuda e pela paciência.

A minha mãe Maria de Lourdes de Oliveira, aos meus filhos Pethrus Jorge de Oliveira Cavalcanti e Victor Gabryel de Oliveira Melo, e a minha comadre Bárbara Keyla Laurindo Gomes, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Eis o meu segredo: só se ver bem com o coração. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas” (O PEQUENO PRÍNCIPE, 1943).

RESUMO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênicas trouxe avanços significativos para o tratamento de certas patologias hematológicas, mais notadamente as leucemias e as síndromes mielodisplásicas, possibilitando desde a remissão de casos até a cura. Este procedimento tem como finalidade a substituição da hematopoiese do receptor a partir de células do doador, proporcionando uma medula óssea saudável que irá desenvolver células sanguíneas livres de células tumorais. Imediatamente após a realização do TCTH alogênico ocorre um quimerismo misto, isto é, coexistência de células sanguíneas características do doador e do receptor do transplante. Análises precoces dos padrões de quimerismo doador/receptor permitem avaliar o grau de sucesso do transplante. A análise quimérica pode ser realizada em amostras de sangue total ou medula óssea, usualmente coletadas em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O STR-PCR é considerada a técnica otimizada para seguimento para Quimerismo de Medula Óssea (QMO). O objeto principal do estudo foi desenvolver metodologia técnico-científica para análise e seguimento do TCTH a partir da coleta de amostras sanguíneas em cartões FTA® e do uso de técnicas de PCR-STR e, em paralelo, desenvolver Plataforma de Análise do Quimerismo da Medula Óssea. Foram confrontados os resultados do TCTH obtidos a partir da extração de DNA de amostras de sangue total coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e da amplificação direta do DNA de discos circulares de Cartões FTA®. De acordo com os resultados obtidos, a partir de 12 dias após o TCTH alogênico, não houve diferença estatisticamente significativa entre as metodologias. Desta forma, a coleta de sangue total em cartões FTA® pode ser usada para análises de seguimento de Quimerismo de Medula Óssea. A Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR), desenvolvida e validada no presente trabalho, contribuiu para a reduzir o tempo de entrega do exame genético quimérico e forneceu cálculos quiméricos precisos, servindo como ferramenta diagnóstica auxiliar para tomada de decisões de condutas terapêuticas.

Palavras-chave: Quimerismo. Medula Óssea. Marcadores STR. Enxertia Cartão FTA®.

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has brought significant advances in the treatment of certain hematological pathologies, most notably leukemias and myelodysplastic syndromes, enabling cases ranging from case remission to cure. This procedure is intended to replace the recipient's hematopoiesis from donor cells, providing a healthy bone marrow that will develop blood cells free of tumor cells. Immediately after HSCT, a mixed chimerism occurs, that is, coexistence of blood cells characteristic of the transplant donor and recipient. Early analysis of donor/recipient chimerism patterns after HSCT allows, among other factors, to assess the degree of transplant success. Chimeric analysis can be performed on whole blood, bone marrow or umbilical cord blood samples, usually collected in a tube containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The STR-PCR is considered the golden follow-up technique for Bone Marrow Chimerism. The main object of the study was to validate technical-scientific methodology for the analysis and follow-up of Bone Marrow Chimerism from the collection of blood samples in an FTA® card and the use of PCR-STR techniques and, ultimately, to develop a Platform for Analysis of the Bone Marrow Chimerism. Currently, its applications include forensic medicine, transgenics, immunohematology, plasmid research, new drug discovery and genomics and available in numerous configurations. In total, 10 patients participated in the study, five children and five adults. The results of Chimerism obtained from DNA extraction from whole blood samples collected in a tube containing EDTA anticoagulant and direct DNA amplification from circular discs of FTA® Cards were compared. According to the results obtained, from D+12 onwards, there was no significant difference between the methodologies with p value = 0.371. In this way, whole blood collection by FTA® cards can be performed for post-HSCT Bone Marrow Chimerism follow-up analyses. The Bone Marrow Chimerism Analysis and Calculation Platform (KimerCalcBR), developed and validated in the present work, helps to reduce the delivery time of the chimeric genetic exam and provides accurate chimeric calculations, which can serve as an auxiliary diagnostic tool for decision making of therapeutic approaches.

Keywords: Chimerstry. Bone marrow. STR markers. Grafting. FTA® Card.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Micrografia eletrônica mostrando DNA aprisionado na matriz FTA® (ampliação de 10 000 X).	20
Gráfico 1	Análise Comparativa das Médias do Quimerismo de acordo com o dia e com a metodologia empregada	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição de pacientes em termos diagnósticos da doença, tipo de doador e tipo de transplante.	21
Tabela 2 –	Amostras não amplificadas de acordo com: o tipo de metodologia, o dia pós-TCTH e contagem global de leucócitos.	23
Tabela 3 –	Quantidade de marcadores STRs por Tipo (1, 2 e 3) entre os respectivos pares doador-receptor e quantidade de marcadores utilizados nas análises quiméricas por Tipo (1 e 2).	24

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AAS - Anemia Aplásica Severa

DECH - Doença de Enxerto Contra Hospedeiro

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DRM - Doença Residual Mínima

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

FISH - Hibridização Fluorescente in situ

GNS - Sequenciamento Massivo Paralelo

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

INDEL – Polimorfismo de Inserção/Deleção

IGFEC - Laboratório do Instituto de Genética Forense Eduardo Campos

LAB - Leucemia Bifenotípica

LABBE - Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva

LLA - Leucemia Linfóide Aguda

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

POP – Procedimento de Operação Padrão

REREME - Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea

REDOME - Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea

RFU - Unidade Relativa de Fluorescência

SDS - Secretaria de Segurança Pública

SES - Secretaria Estadual de Saúde

SP – Polimorfismo de Sequência

STR – repetições curtas em tandem

TALE - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH - Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH)	20
3.2 Short Tandem Repeats (STR)	22
3.3 Cartão FTA	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Análise da Enxertia em Pacientes Submetidos ao TCTH Alogênico a partir da	
Análise de Cartões FTA® e Desenvolvimento de Ferramenta Computacional	24
Resumo	24
Abstract.....	26
Introdução	27
Materiais	30
Declaração de Ética	30
Tipo de Estudo	30
Grupo de Estudo	30
Coleta do Material Biológico	31
Amostras Pré-Transplante	31
Amostras Pós-Transplante	31
Extração do DNA	31
Quantificação do DNA	32
PCR Multiplex	32
Eletroforese Capilar e Análise de Dados	33
Critérios de Escolha dos Marcadores Alélicos e Cálculo da Análise do	
Quimerismo	34
Análise Estatística	34
Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea.....	35
Resultado	35
Discussão	42

Desempenho da Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula	
Óssea (KimerCalcBR)	46
Conclusão	49
Perspectiva	50
Agradecimentos	50
Referências	51
5 SÚMULA CURRICULAR	54

1 INTRODUÇÃO

O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) alogênico trouxe avanços significativos para o tratamento de certas patologias hematológicas, mais notadamente as leucemias e as síndromes mielodisplásicas, possibilitando remissões e até mesmo cura. Este procedimento tem como finalidade a substituição da hematopoiese do paciente (receptor) a partir de células do doador, proporcionando uma medula óssea saudável que irá desenvolver células sanguíneas livres de células tumorais. Além disso, o transplante promove uma ação antitumoral alógena através de leucócitos imunocompetentes, levando a eliminação de células malignas remanescentes (DUBOIS *et al.*, 2017).

Após o TCTH alogênico, é importante saber se o sistema hematopoiético em desenvolvimento tem origem doadora ou receptora. Nesse caso, a análise genética que investiga a origem do genótipo é conhecida como "Quimerismo" (DUMACHE, 2018). Vários biomarcadores foram propostos para o estudo do Quimerismo tendo, até o momento, o método de STR-PCR (amplificação de alelos de *locus* STR através de reação de duplicação em cadeia dos marcadores dirigida por uma enzima DNA polimerase termorresistente) como técnica otimizada para esta finalidade (TSENG *et al.*, 2014; CLACK *et al.*, 2015; NAVARRO-BAILÓN, 2020).

Análises precoces dos padrões de Quimerismo doador/receptor após o TCTH alogênico podem auxiliar a tomada de decisões clínicas, sendo importantes na predição de sucesso ou fracasso de enxertia, além de prenunciar a persistência de doenças com presença de células tumorais a partir de coleta de sangue ou de medula. Estas análises também são úteis como guias da imunoterapia adaptada ao risco para profilaxia e terapia intervencionista da Doença de Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) ou recaída iminente (FORMANKOVA *et al.*, 2000; SERRANO *et al.*, 2000). A análise de Quimerismo ainda pode dar subsídio clínico para diminuição precoce da imunossupressão e da administração de terapia resgate, como a infusão de leucócitos doadores (CLARK *et al.*, 2015; SHIMONI; NAGLER, 2001).

De acordo com dados da Secretaria Estadual de Saúde (SES) do Estado de Pernambuco, realiza-se transplantes de medula óssea no estado de Pernambuco desde 1999, tendo sido realizados 2.186 transplantes até julho de 2017 (PERNAMBUCO, 2017). Além disto, ainda segundo a SES, entre janeiro e agosto de 2019 já foram realizados 165 transplantes medula óssea no Estado, o que

significa um aumento de 12% em relação a 2018 (147 transplantes) (PERNAMBUCO, 2019). Apesar disso e da reconhecida importância da avaliação de Quimerismo no seguimento do paciente submetido ao TCTH, ainda não há nenhum laboratório especializado na Região Nordeste na prestação de serviço de genotipagem voltada ao acompanhamento da evolução do Quimerismo e comprovação de enxertia em pacientes pós-TCTH.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver protocolo técnico-científico para seguimento do Quimerismo/Enxertia pós-TCTH alogênico, a partir da coleta de amostras sanguíneas em Cartão FTA® e uso de técnicas de PCR-STR, visando servir como ferramenta diagnóstica auxiliar para tomada de decisões de condutas terapêuticas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o tempo mínimo médio necessário para que seja iniciado o acompanhamento genético do Quimerismo de Medula Óssea e possível ocorrência de Enxertia, através do uso de técnicas de PCR-STR.
- Confrontar resultados (porcentagens) dos cálculos do Quimerismo de Medula Óssea entre metodologia descrita na literatura a partir da extração de DNA de amostras de sangue total coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e a partir da amplificação direta do DNA de discos circulares de Cartões FTA® sem qualquer pré-tratamento.
- Desenvolver plataforma computacional capaz de automatizar os processos de análise estatística necessários para o acompanhamento da evolução do Quimerismo pós TCTH alogênico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) alogênica é utilizado como terapia curativa para um grande número de doenças hematológicas ou não, de natureza maligna ou benigna. Consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição da hematopoese. O transplante pode ser autogênico, quando a medula ou as células precursoras de medula óssea provêm do próprio indivíduo transplantado (receptor), ou alogênico, quando as células provêm de outro indivíduo (doador) (CONITEC, 2016). O doador pode ser uma pessoa aparentada ou não aparentada. No primeiro caso, o doador é uma pessoa da própria família, geralmente, um irmão, o pai ou a mãe. Caso não haja compatibilidade dentro da família, o paciente é cadastrado no Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea (REREME) e se inicia uma busca por doador compatível no Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME) e nos Bancos Públicos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário. Caso ainda não se consiga achar um doador brasileiro compatível, é realizada busca internacional (REDOME, 2021).

Em relação às hemopatias malignas, os objetivos do aloenxerto são (1) substituir a hematopoiese do receptor pela doadora, (2) o enxerto estar livre de qualquer célula tumoral e (3) induzir uma resposta anti-tumoral alogênica no receptor que geralmente é exercido através das células imunocompetentes do enxerto. Seu uso aumentou com a introdução de regimes de condicionamento de intensidade reduzida, melhoramento do antígeno leucocitário humano (HLA), disponibilidade de doadores (incluindo sangue do cordão umbilical) e melhores cuidados de suporte, os quais melhoraram a segurança do procedimento e estenderam sua aplicação a grupos etários mais idosos (GRATWOHL *et al*, 2013; CLARK *et al*, 2015). Apesar de tais progressos, o TCTH alogênico permanece um procedimento de alto risco, com riscos de complicações infecciosas, doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) e falha do enxerto (CLARK *et al*, 2015).

Antes da transfusão do enxerto alogênico, é necessário administrar um regime de condicionamento, traduzido como sendo uma quimioterapia em altas doses que tem como objetivo destruir a medula óssea doente, além de

imunossuprimir o receptor do transplante para que ele aceite a nova medula, sem rejeição. Este preparo para o transplante tem altos valores de mortalidade, entre 20 e 30%. Por isso, tem-se preconizado a diminuição da intensidade do regime de condicionamento, o que resulta em menor mortalidade. Essa técnica produz uma transformação mais lenta dos tipos celulares do receptor para os tipos celulares do doador, resultando em quimerismo misto durante vários meses. (SYNDERCOMBE COURT et al., 2004).

Imediatamente após a realização do TCTH alogênico, ocorre uma coexistência de células sanguíneas características do doador e do receptor do transplante. Nesse caso, a análise genética que investiga a origem do genótipo é conhecida como "Quimerismo" (DUMACHE, 2018). A análise dessa mistura permite, entre outras coisas, avaliar precocemente o grau de sucesso do transplante. A reconstituição das células de linhagens sanguíneas pelas células derivadas exclusivamente do doador é um sinalizador de que o enxerto foi bem-sucedido, sendo chamado de Quimerismo Completo (QC). Outrossim, a falha do transplante pode ser precocemente predita a partir da constatação da não diminuição do percentual de células de origem do receptor após o transplante, situação conhecida como Quimerismo Misto (QM). Ademais, células autólogas malignas ocultas podem ter sobrevivido ao regime de condicionamento mieloablativo pré-transplante e terem escapado da vigilância por células efetoras imunes alógenas, indicando Doença Residual Mínima (DRM) (ELMAAGACLI et al., 1996; FRANKEL A.; CORRINGHAM, R. E. T.; SHEPHERD, S.; REARDEN, A.; WANGRODRIGUEZ, J., 1996).

Vários tipos de ensaios têm sido usados para determinar o Quimerismo após o transplante de medula óssea alogênica. Métodos com baixa sensibilidade, como a análise de FISH ou ensaios específicos baseados em proteínas (antígeno eritrocitário ou isoenzima), foram substituídos nos últimos anos por tecnologias baseadas na análise de polimorfismos de DNA. Qualquer região polimórfica do genoma humano pode ser usada como marcador molecular de identificação humana de um indivíduo, o que permite que as células do doador sejam distinguidas das células do hospedeiro (DUBOIS, V. et al., 2017; NOLLET, 2001).

A análise do quimerismo após o transplante alogênico de células-tronco tem sido um método de rotina para a avaliação do enxerto e detecção precoce da falha do enxerto (LEJMAN, 2019; CLEMENTE, 2017; NOLLET, 2001). Depois do transplante, em muitos casos, observou-se que a hematopoiese do receptor e

doador coexiste nos receptores. Essa situação é chamada "quimerismo misto" (MC). Nesse MC, no pós-transplante estão presentes os genótipos de doadores e receptores. Se com o passar do tempo, todas as células hematopoiéticas tiverem origem do doador, isso é chamado de "quimerismo completo" (CC). No CC, na amostra pós-transplante, apenas o DNA do doador é presente (DUMACHE, 2018). Quando os condicionamentos pré-transplante são do tipo "não mieloablativos" ou "de intensidade reduzida", a retomada da hematopoiese é mais lenta e gradual, sendo a avaliação de Quimerismo de particular interesse (DUBOIS, 2017).

O quimerismo pode ser estudado no sangue periférico ou na medula óssea, bem como em subconjuntos específicos de leucócitos, purificados por meio de tecnologia imunomagnética (TSENG *et al.*, 2014; CLACK *et al.*, 2015; NAVARRO-BAILÓN, 2020). A avaliação do Quimerismo deve rastrear mudanças progressivas e, por isto, não deve ser realizada uma única vez em um único momento com valores isolados mas de forma a torna-se particularmente importante no seguimento dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico (DUBOIS *et al.*, 2017).

No seguimento de um paciente neoplásico, quando o número de células malignas é tão baixo que só pode ser detectado por técnicas sensíveis, é chamado de Doença Residual Mínima (DRM). Embora existam técnicas para a detecção de MRD que fornecem maior sensibilidade e especificidade, elas não estão disponíveis para todos os pacientes e o quimerismo pode ser usado como uma análise substituta. A análise de quimerismo é de fundamental importância para o acompanhamento dos pacientes transplantados, uma vez que pode direcionar a implantação de medidas imunomodulatórias para o manejo de diferentes complicações pós-TCTH, que são mais eficazes quando realizadas de maneira precoce (NAVARRO-BAILÓN *et al.*, 2020).

Várias técnicas de biologia molecular podem ser usadas para determinar e quantificar o Quimerismo. Elas se distinguem pelos marcadores utilizados (microssatélites, polimorfismos do tipo INDel - Inserções e Deleções), métodos e nível de sensibilidade: (a) Repetições Curtas em Tandem (STR) - baseada na análise de regiões repetidas (microssatélites); (b) Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) - baseada na análise de Polimorfismos do tipo INserções / DEleções (INDel); (c) PCR associado a uma reação de Sequenciamento Massivo Paralelo (GNS) - onde o número de vezes que uma sequência é observada representa sua frequência normalizada em relação a um marcador alélico único e (d)

PCR digital - é realizada uma PCR em gotículas, onde cada gota pode ser considerada como um tubo independente de outros (DUBOIS, 2017).

Os testes podem ser realizados em sangue periférico, aspirado de medula óssea ou em subconjuntos de células separados por uma variedade de métodos (isto é, análise específica de linhagens). Qualquer que seja a técnica usada, um Quimerismo deve ser considerado Parcial, Misto ou Incompleto quando o valor é menor do que 95% de células do genótipo do doador. A definição de um Quimerismo Total ou Completo ou Enxertia é uma função da sensibilidade da técnica utilizada e pode variar entre 95 a 99,9% de células do genótipo do doador; não havendo necessidade de intervenção terapêutica específica. Um quimerismo entre 90 e 95% do doador, independentemente do tempo de análise, requer reavaliação precoce. Um Quimerismo inferior a 90% do doador requer na maioria dos casos, uma intervenção terapêutica (DUBOIS, 2017; CLARK *et al*, 2015).

3.2 SHORT TANDEM REPEATS (STR)

Sequências de DNA repetidas são difundidas em todo o genoma humano. Essas regiões são tipicamente classificadas em vários grupos, dependendo do tamanho da região de repetição. (THIEDE, C. *et al*, 1999). STRs são repetições polimórficas em tandem, de 2 a 6 nucleotídeos, distribuídas por todo o genoma. A natureza altamente polimórfica das STRs resulta em uma alta probabilidade de que um painel de marcadores podem permitir a diferenciação entre genomas individuais (CLARK *et al*, 2015).

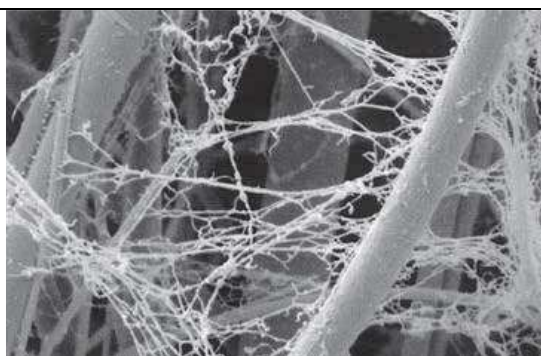
A amplificação de amostras do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) por PCR podem ser mais bem realizadas com produtos-alvos de menores tamanhos. Devido ao seu tamanho menor, os alelos STR podem ser separados de outros locais cromossômicos com mais facilidade para garantir que locos intimamente ligados ao escolhido não sejam amplificados erroneamente (JIGNAL *et al*, 2014). A natureza altamente polimórfica das STRs resulta em uma alta probabilidade de que um painel de marcadores podem permitir a diferenciação entre genomas individuais. Os microssatélites são usados em casos em relação à identificação humana da maternidade, paternidade ou de relacionamento de parentesco. Além disso, as STRs representam o método predominante para monitoramento do quimerismo co-hematológico em pacientes após transplante alogênico de células-tronco

(DUMACHE, 2018; CLARK et al, 2015).

3.3 Cartões FTA®

Inicialmente, os cartões FTA® foram idealizados para atender às necessidades de armazenamento barato, de baixa manutenção, de fácil transporte e de longo prazo de amostras biológicas, por permitir que o DNA seja armazenado em temperatura ambiente por anos, sem custos com instalações ou condições de armazenamento (CARTER, 2012; BURGOYNE, 1996). São papéis de filtro quimicamente tratados que servem para a preservação do DNA. Eles contêm produtos químicos que lisam células, desnaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos de nucleases, da oxidação e dos danos provocados pela luz ultravioleta. Possuem a propriedade de inativar rapidamente organismos, incluindo agentes patogênicos transportados no sangue, e impedir o crescimento de bactérias e outros microrganismos. (MERCK, 2020).

Figura 1 - Micrografia eletrônica mostrando DNA aprisionado na matriz FTA® (ampliação de 10000X)



Fonte: Copyright © 2011 GE Healthcare Corporation.

Os cartões FTA® apresentam como vantagens principais: a captura, imobilização e estabilização do DNA de amostras biológica sem que seja necessária a etapa de extração, o que torna o processo de obtenção de perfil genético mais rápido e com menor custo. Além disto, para facilitar o manuseamento de amostras incolores, existe a versão de cartões FTA® indicadores que mudam de cor quando a amostra é aplicada.

As amostras para análise quimérica são, usualmente, coletadas em tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e passam pelos processos de extração, normalização, amplificação e genotipagem, segundo protocolos pré definidos pelos fabricantes dos kits. No entanto, os Cartões FTA®

podem ser amplificados diretamente sem passar pelas etapas de extração, quantificação e normalização, diminuindo custos e possibilidade de contaminação do material.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigos.

ANÁLISE DA ENXERTIA EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TCTH ALOGÊNICO A PARTIR DA ANÁLISE DE CARTÕES FTA E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTA COMPUTACIONAL

Oliveira, Keyla P. de^{1,2}; Sampaio, Bruno¹; Júnior, Sérgio de Sá Leitão Paiva³; Souza, Carlos Antonio²; Baleeiro, Camila Reis Guimarães^{1,2}; Oliveira, Natália Cybelle Lima Oliveira²; Balbino, Valdir Queiroz¹

¹*Universidade Federal de Pernambuco, UFPE*

²*Instituto de Genética Forense Eduardo Campos, IGFEF*

³*Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE*

Resumo

O Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH) alogênico é uma importante ferramenta terapêutica para muitos distúrbios hematológicos e não-hematológicos, benignos e malignos. Após a sua realização, ocorre um tipo de Quimerismo Misto, isto é, a coexistência de células sanguíneas características do doador e do receptor do transplante. Análises precoces e o monitoramento dos padrões de quimerismo doador/receptor após o transplante permitem, entre outras coisas, avaliar o grau de sucesso do procedimento e aplicar de forma eficaz tratamentos preventivos. Várias técnicas de biologia molecular podem ser usadas para determinar e quantificar o Quimerismo, no entanto, a análise de STR-PCR é considerada a técnica otimizada para seguimento de Quimerismo de Medula Óssea a partir de amostras de sangue total ou medula óssea coletadas em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os cartões FTA® possuem aplicações diversas, incluindo a medicina forense, os transgênicos, a imuno-hematologia, a pesquisa de plasmídeos, a descoberta de novas drogas e a genômica por permitir que o DNA seja armazenado em temperatura ambiente por anos, sem comprometimento da sua qualidade, além de dispensar as etapas de extração, quantificação e normatização do DNA e, conseqüentemente, diminuição de

manipulação de amostras, riscos de contaminação e custos financeiros. Não há relatos na literatura do uso dos Cartões FTA® para a coleta de material biológico para análise de Quimerismo de Medula Óssea, sendo este o objetivo principal do presente trabalho, através do uso de técnicas de PCR-STR. Em paralelo, foi desenvolvida Plataforma de Análise do Quimerismo da Medula Óssea primordial para diminuição do tempo de cálculos quiméricos de percentagem, fornecimento de resultados precisos e celeridade na entrega dos resultados dos exames. Ao total, participaram do estudo 10 pacientes, dos quais foram realizadas coletas sucessivas de sangue após a realização do TCTH alogênico. As amostras sanguíneas foram analisadas por duas metodologias distintas: a partir da extração de DNA de amostras de sangue total coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e a partir da amplificação direta do DNA de discos circulares de Cartões FTA® sem qualquer pré-tratamento. A amplificação por PCR foi realizada com emprego do kit *PowerPlex® Fusion 6C System* (Promega Corporation); os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar através do sequenciador *ABI 3500 GeneticAnalyzer*, com auxílio do *3500 Series Data Collection Software v.3.0 (Applied Biosystems)* e a discriminação da genotipagem foi realizada através do software *GeneMapper® ID-X* versões 1.4 ou 1.6 (*Applied Biosystems*) com detecção de picos de fluorescência com, no mínimo, 100 Unidades Relativas de Fluorescência (RFUs). Os cálculos de Quimerismo de Medula Óssea foram realizados a partir da Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR) desenvolvida e validada neste estudo. As análises estatísticas entre as metodologias empregadas foram realizadas através do Teste T-pareado uma vez que as amostras são oriundas dos mesmos pacientes. Valores foram considerados estatisticamente significativos para $p\text{-value} < 0,05$. A partir de D+12, não houve diferença significativa entre as amostras que foram extraídas (BTA) e aquelas que foram amplificadas diretamente (FTA®). Desta forma, a coleta de sangue total por cartões FTA® podem ser realizadas para análises de seguimento de Quimerismo de Medula Óssea pós-TCTH.

Palavras-chave: Quimerismo. Medula óssea. Marcadores STR. Enxertia. Cartão FTA®.

Abstract

Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is an important therapeutic tool for many benign and malignant hematologic and non-hematologic disorders. After its completion, a type of Mixed Chimerism occurs, that is, the coexistence of blood cells characteristic of the transplant donor and recipient. Early analysis and monitoring of donor/recipient chimerism patterns after the transplant allow, among other things, to assess the degree of success of the procedure and effectively apply preventive treatments. Various molecular biology techniques can be used to determine and quantify Chimerism, however, an STR-PCR analysis is considered an optimized technique for tracking Bone Marrow Chimerism from whole blood or bone marrow collected in an acid-containing tube. ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). FTA® cards have diverse applications, including forensic medicine, transgenics, immunohematology, plasmid research, new drug discovery and genomics by allowing DNA to be stored at room temperature for years without compromising the its quality, in addition to eliminating the steps of extraction, quantification and standardization of DNA and, consequently, a reduction in handlers, contamination risks and financial costs. There are no reports in the literature on the use of FTA® Cards for the collection of biological material for the analysis of Bone Marrow Chimerism, which is the main objective of the present work, through the use of PCR-STR techniques. In parallel, a primordial Bone Marrow Chimerism Analysis Platform was developed to reduce the time of percentage chimeric calculations, provide accurate results and speed in the delivery of exam results. In total, 10 patients participated in the study, of whom successive blood collections were performed after allogeneic HSCT. Bloods were analyzed by two different methodologies: from the extraction of DNA from whole blood collected in a tube containing EDTA anticoagulant and from direct DNA amplification from circular discs of FTA® Cards without any pre-treatment. PCR amplification was performed using the PowerPlex® Fusion 6C System kit (Promega Corporation); the amplified fragments were separated by capillary electrophoresis using the ABI 3500 GeneticAnalyzer sequencer, with the aid of the 3500 Series Data Collection Software v.3.0 (Applied Biosystems) and the genotyping discrimination was performed using the GeneMapper® ID-X software versions 1.4 or 1.6 (Applied Biosystems) with fluorescence spot detection with at least 100 Relative Fluorescence Units (RFUs).

Bone Marrow Chimerism calculations were performed using the Bone Marrow Chimerism Analysis and Calculation Platform (KimerCalcBR) developed and validated in this study. Statistical analyzes between the methodologies used were performed using the paired T-test since they come from the same patients. Values were considered statistically considered for p-value <0.05 . From D + 12, there was no significant difference between the shots that were extracted (BTA) and those that were amplified directly (FTA®). In this way, whole blood collection from FTA® cards can be performed for post-HSCT Bone Marrow Chimerism follow-up analysis.

Key words: Chimerism. Bone marrow. PCR-STR. Grafting. FTA® card.

Introdução

O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH alogênico) trouxe avanços significativos para o tratamento de certas patologias hematológicas, mais notadamente as leucemias e as síndromes mielodisplásicas, possibilitando remissões e até mesmo a cura. Este procedimento tem como finalidade a substituição da hematopoiese do paciente (receptor) a partir de células do doador, proporcionando uma medula óssea saudável que irá desenvolver células sanguíneas livres de células tumorais. (DUBOIS et al., 2017).

Imediatamente após a realização do TCTH, ocorre um Quimerismo Misto, que vem a ser a coexistência de células sanguíneas características do doador e do receptor do transplante. A análise dessa mistura permite, entre outras coisas, avaliar precocemente o grau de sucesso do transplante. (ELMAAGACLI et al., 1996; FRANKEL A.; CORRINGHAM, R. E. T.; SHEPHERD, S.; REARDEN, A.; WANGRODRIGUEZ, J., 1996). Vários biomarcadores foram propostos para quantificação de quimerismo, sendo até o momento, o método de STR-PCR a técnica otimizada utilizada. As amostras para análise quimérica são, usualmente, coletadas em tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TSENG et al., 2014; CLACK et al., 2015; NAVARRO-BAILÓN, 2020). Apesar dos Cartões FTA® possuírem aplicações diversas, incluindo a medicina forense, os transgênicos, a imuno-hematologia, a pesquisa de plasmídeos, a descoberta de novas drogas e a genômica (MERCK, 2020), seu uso ainda não foi aplicado como suporte para análise no seguimento/enxertia do Quimerismo de

Medula Óssea.

O objeto principal deste estudo foi analisar o uso dos Cartões FTA® como suporte para coleta de amostras de sangue para análise do Quimerismo de Medula Óssea em pacientes submetidos ao TCTH alogênico, bem como avaliar o tempo mínimo médio necessário para ocorrência de Enxertia, através do uso de técnicas de PCR-STR. Em paralelo, foi desenvolvida plataforma computacional para realização de cálculos e análises quiméricas precisas em um menor intervalo de tempo e, consequentemente, fornecimento de resultados e redução no tempo de entrega do exame genético para a equipe médica.

Materiais e métodos

Declaração de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Plataforma Brasil, que conferiu o parecer consubstanciado sob o número 3.853.568, em 21 de fevereiro de 2020, estando a presente pesquisa, portanto, de acordo com a Resolução Conselho Nacional de Saúde nº. 466 de 12 de dezembro de 2012.

Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo de coorte longitudinal observacional.

Grupo de Estudo

Ao total, participaram do estudo 10 pacientes, cinco dos quais eram crianças com idades entre 4 e 11 anos (quatro meninos e uma menina); e cinco eram adultos, com idades entre 32 e 60 anos (sendo três homens e duas mulheres). A distribuição de pacientes em termos diagnóstico da doença, tipo de doador e tipo de transplante é apresentada na Tabela 01. Todos os metadados foram coletados a partir dos prontuários dos pacientes.

Tabela 1 - Distribuição de pacientes em termos diagnóstico da doença, tipo de doador e tipo de transplante. LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda; AAS - Anemia Aplásica Severa; LMA - Leucemia Mielóide Aguda; LMC - Leucemia Mielóide Crônica; LAB - Leucemia Bifenotípica

Variáveis	Categorias	Número / Total de Pacientes
Diagnóstico	LLA	3 /10
	AAS	2/10
	LMA	2/10
	LMC	2/10
	LAB	1/10
Tipo de Transplante	Alogênico	8/10
	Haploidêntico	2/10
Tipo de Doador	Aparentado	8/10
	Não-aparentado	2/10

Fonte: A Autora (2021)

Coleta do Material Biológico

- Amostras Pré-Transplante

Antes do transplante, foram realizadas coletadas de mucosa bucal dos pacientes em cartões FTA®, com o auxílio do EasiCollect device (GE Healthcare), dos pares doadores-receptores para a determinação dos seus perfis genéticos autossômicos e, adicionalmente, seleção de quais STRs seriam utilizadas para os cálculos do quimerismo, com exceção de um doador proveniente do REDOME. Neste caso, o perfil genético foi obtido a partir da deconvolução dos eletroferogramas.

- Amostras Pós-Transplante

Para seguimento e monitoramento do quimerismo pós-TCTH, foram realizadas coletas sucessivas de amostras de sangue dos receptores nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30, ou até a alta hospitalar do paciente. Para cada amostra coletada, foram resgatados os resultados dos exames de hemograma nos prontuários do paciente. Foi usada a sigla “D+ seguida de um número” para designar o dia, a partir do dia do transplante, no qual foi coletada a amostra. Por exemplo, a amostra “D+3” foi coletada no terceiro dia a partir do dia do transplante. As siglas “R”

e “S” significam , respectivamente, Receptor e Doador.

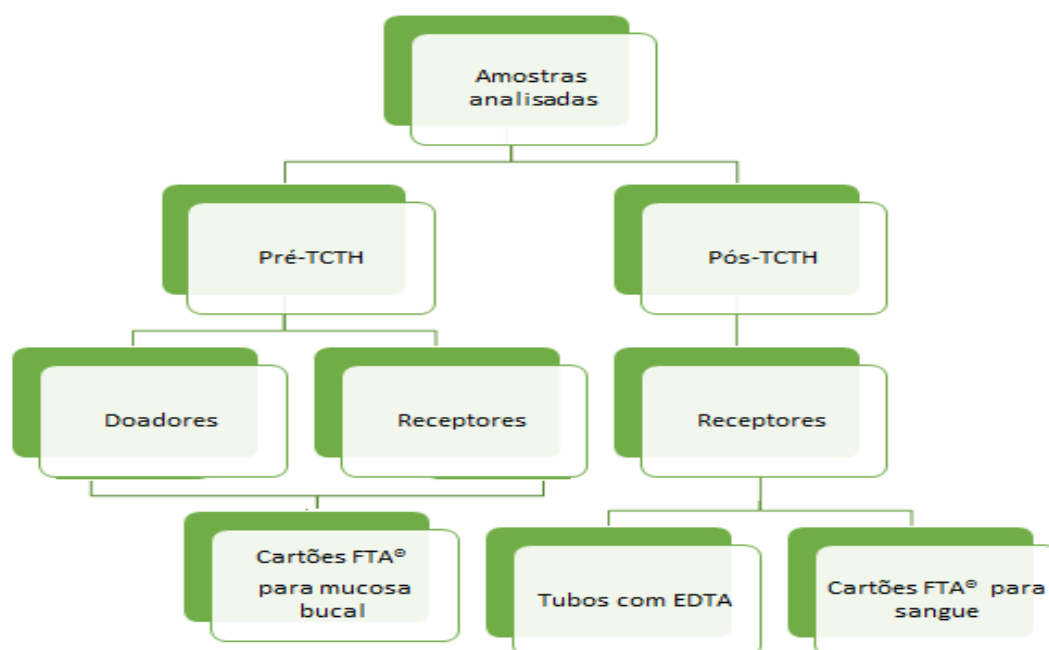
Nesta etapa, as amostras de sangue foram colhidas de forma clássica em tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Posteriormente, foram pipetados 100 µL de cada amostra sanguínea e gotejados no meio da área do círculo de coleta do Cartão FTA® Clássico com indicador de cor (Indicating FTA® Classic Card); os quais foram deixados à temperatura ambiente de 12 a 24 horas para secar.

Extração do DNA

As amostras de sangue colhidas em tubo contendo EDTA foram submetidas à extração de DNA pelo sistema automatizado de extração e purificação AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System, com a utilização do Kit PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction (ThermoFisher Scientific).

Para as amostras de mucosa bucal e de sangue colhidas em cartões FTA® (Whatman™), não se procedeu à extração de DNA, uma vez que o próprio cartão contém substâncias químicas que lisam as células presentes no filtro e liberam o DNA, disponibilizando o material genético para a etapa de amplificação.

Figura 1 – Fuxograma das Amostras Analisadas



Quantificação do DNA

O DNA extraído das amostras de sangue coletadas em tubos contendo EDTA foi quantificado no equipamento 7500 *Real Time PCR System* (Life Technologies), com auxílio do HID *Real Time PCR Analysis Software* v.1.2 (Applied Biosystems), com o emprego dos kits de quantificação PowerQuant® System (Promega Corporation) ou Investigator Quantiplex Pro (Qiagen) e, posteriormente, normatizadas numa concentração de DNA de 1ng/μL para servir de input para amplificação.

PCR Multiplex

A amplificação por PCR foi realizada em tubos de 0,2mm com emprego do kit PowerPlex® Fusion 6C System (Promega Corporation), totalizando 27 *locis* gênicos, em termociclador Veriti® 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems – Foster City, Califórnia, EUA). Para o input de amostras, foram usados:

- (1) 2μL nos casos de amostras de sangue extraídas e previamente normalizadas após quantificação, 5.5μL de água, grau de amplificação, 2.5μL de 5X Master Mix PowerPlex® Fusion 6C e 2.5μL de 5X Primer Pair Mix, totalizando 12.5 μL de volume final de reação;
- (2) 1 disco circular para as amostras de cartão FTA® contendo mucosa bucal ou sangue, 7.5μL de água, grau de amplificação, 2.5μL de 5X Master Mix PowerPlex® Fusion 6C e 2.5μL de 5X Primer Pair Mix, totalizando 12.5 μL de volume final de reação.

A perfuração dos Cartões FTA® foi realizada com o perfurador manual de Harris Uni-Core (GE Healthcare) com obtenção de disco(s) circular(es) de diâmetro único de 1,2 mm, os quais foram adicionados à reação de PCR sem qualquer pré-tratamento. No momento do picote, houve o transpasse de todo o volume do Cartão FTA® para que a quantidade máxima de DNA por milímetro cúbico de papel fosse alcançada, independente da concentração de células brancas de cada amostra.

O protocolo da PCR utilizado para todas as amostras de DNA extraído consistiu de 96°C por 1 minuto, seguidos por 25 ciclos de 96°C por 5 segundos e 60°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final de 60°C por 10 minutos, permanecendo em espera a 4°C para seguimento do protocolo de Eletroforese Capilar.

Eletroforese Capilar e Análise de Dados

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar através do sequenciador *ABI 3500 GeneticAnalyzer*, com auxílio do *3500 Series Data Collection Software v.3.0 (Applied Biosystems)*, usando polímero POP-4 (*Life Tecnologias*) e um arranjo capilar de 36 cm, com análises de 23 STRs autossômicos (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, PENTA E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, PENTA D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045 e FGA), 3 STRs do cromossomo Y (DYS391, DYS576 e DYS570) e a amelogenina, seguindo o protocolo de uso do fabricante do equipamento.

Para detecção dos fragmentos de DNA das amostras, foi utilizada uma mistura de 9,5 µL Hi-Di Formamida (*Life Technologies*), 0,5 µL de Size Standard e 2,0 µL de DNA amplificado ou escada alélica. As amostras foram desnaturadas em 95°C por 3 min em termociclador Veriti® 96-Well ThermalCycler e imediatamente colocadas em refrigerador por 3 min.

A discriminação da genotipagem foi realizada através do software *GeneMapper® ID-X* versões 1.4 ou 1.6 (*Applied Biosystems*), na caracterização dos perfis para os marcadores genéticos utilizados com Painel do F6C para detecção de picos de fluorescência com no mínimo 100 Unidades Relativas de Fluorescência (RFUs), de acordo com o Procedimento Operacional Padrao (POP) de Interpretação e Análise de Misturas utilizado no IGFECC.

Critérios de Escolha dos Marcadores Alélicos e Cálculo da Análise do Quimerismo

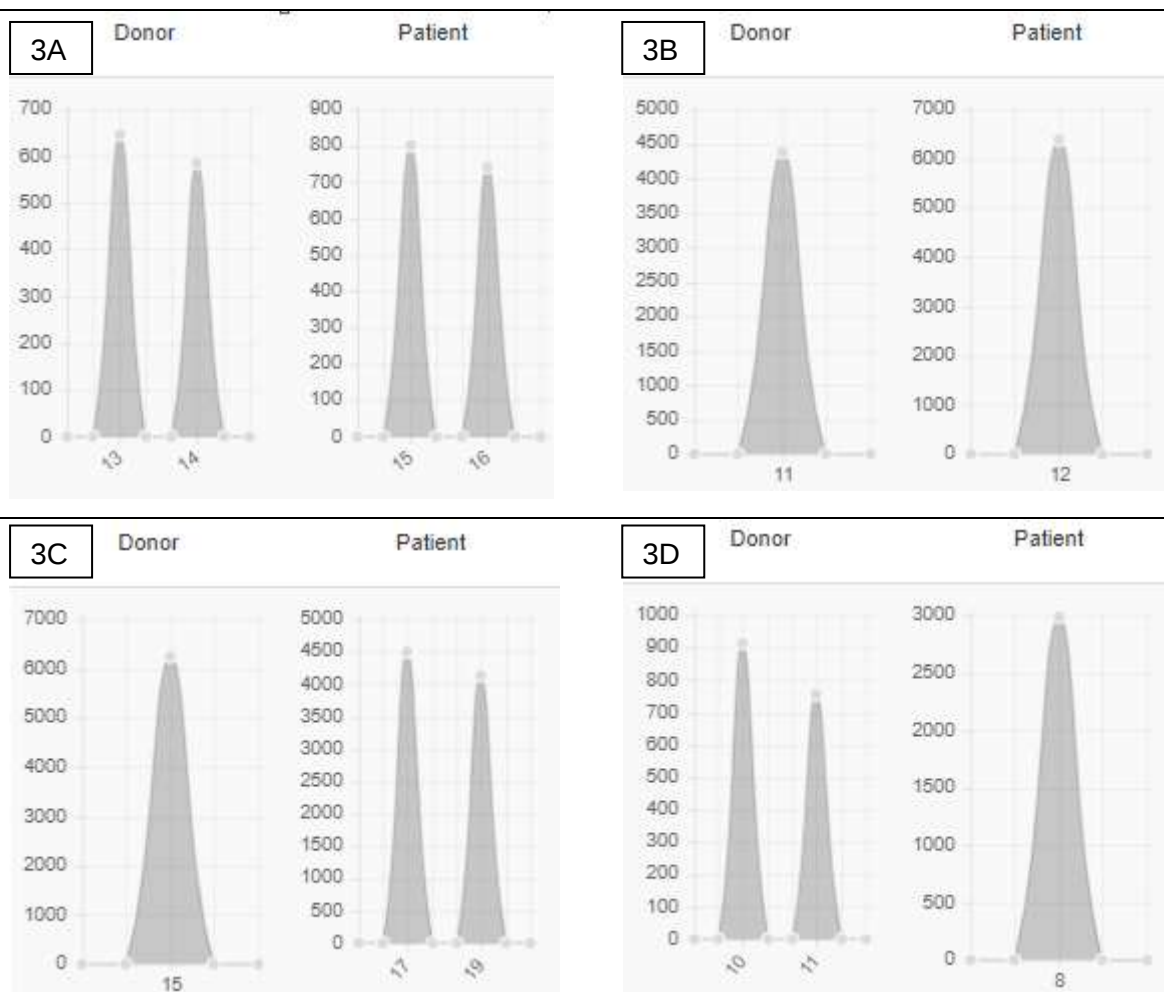
Antes da realização do transplante, foi obtido o perfil genético de referência dos pares doador-receptor para saber quais alelos eram ou não compartilhados entre eles. A partir destes dados, foi utilizada a análise quimérica descrita por Thiede *et al* (1999), o qual descreve os marcadores STRs como: Tipo 1 (Totalmente Informativos), Tipo 2 (Informativos) e Tipo 3. Cada um dos tipos de marcadores possuem uma fórmula matemática que expressa a porcentagem do Quimerismo para determinada região alélica.

Os Marcadores STRs do Tipo 1 (Totalmente Informativo) são aqueles em que doador-receptor não compartilham alelos naquela região gênica, sendo o quimerismo calculado pela fórmula:

$$\% \text{ Quimerismo} = \frac{C + D}{(C+D) + (A+B)} \times 100, \text{ onde A e B são os alelos do receptor, C e D são os alelos do doador.}$$

Na Figura 3 abaixo, podem ser observados exemplos de Marcadores STRs do Tipo 1, onde: (1) na 3A, tanto o doador quanto o receptor são heterozigotos com os alelos diferentes entre si; (2) na 3B, o par doador-receptor são homozigotos com alelos distintos entre si e (3) nas 3C e 3D um dos membros do par é homozigoto e seu par é heterozigoto.

Figura 3 - Marcadores STRs Tipo 1 – Totalmente informativos (doador-receptor não compartilham alelos naquela região gênica).

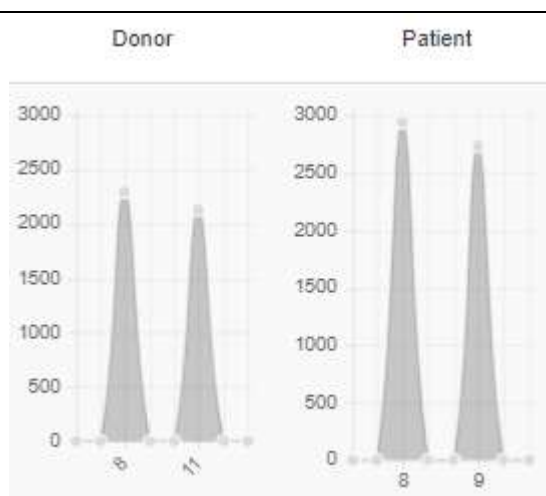


Fonte: A Autora (2021).

Os Marcadores STRs do Tipo 2 (Informativo) são aqueles nos quais doador-receptor são heterorigotos, mas possuem um alelo em comum na região gênica em estudo. Nestes casos, o alelo compartilhado pode ser desconsiderado no cálculo de acordo com a fórmula abaixo e exemplificado na Figura 4:

$$\% \text{ Quimerismo} = \frac{C}{(A+C)} \times 100, \quad \text{onde A é o alelo do receptor, C é o alelo do doador.}$$

Figura 4 - Marcador STR Tipo 2 – Informativo (doador-receptor são heterorigotos mas possuem um alelo em comum região gênica em estudo).



Fonte: A Autora (2021).

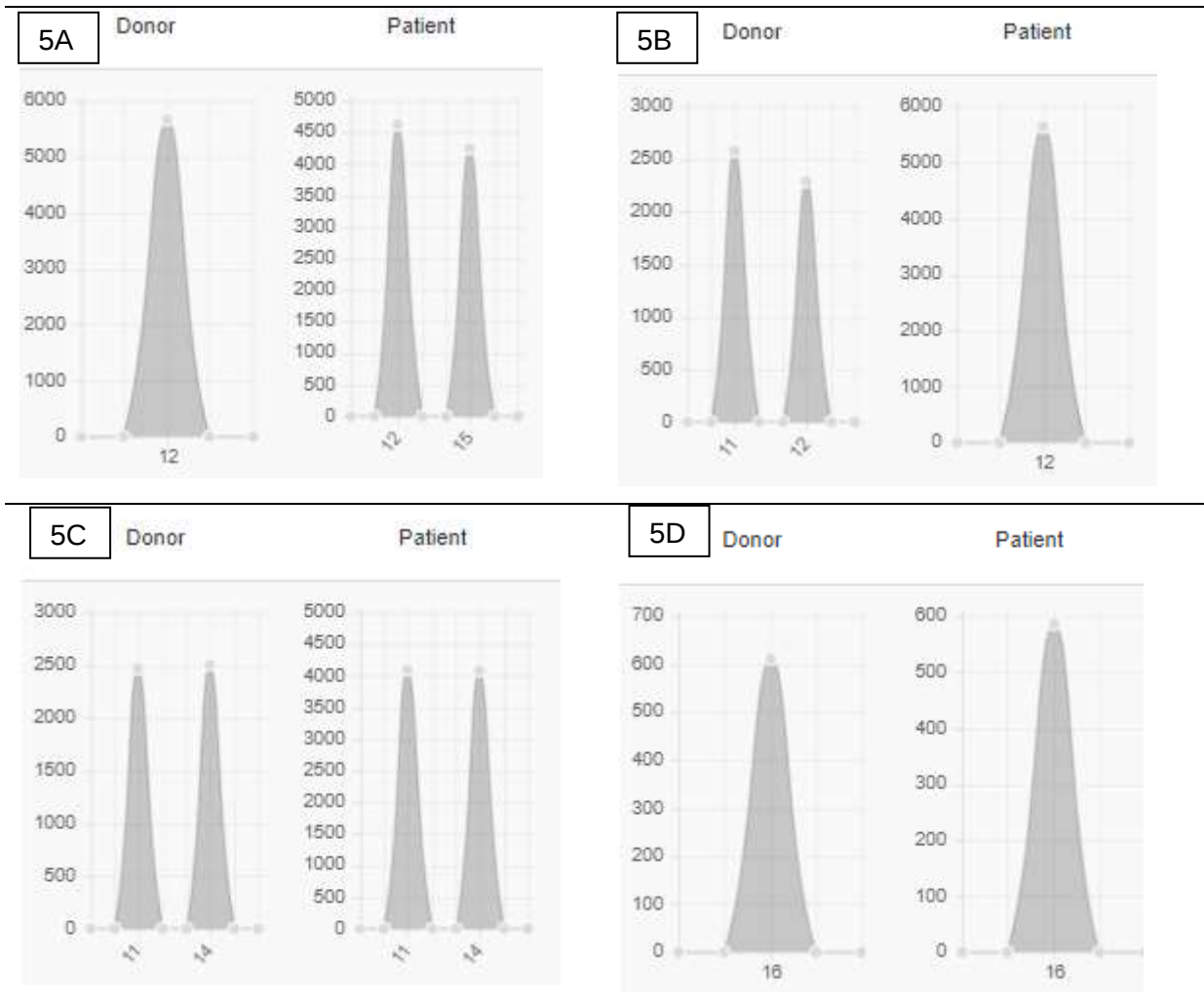
Os Marcadores STRs do Tipo 3 são aqueles onde (1) o doador ou o receptor é heterozigoto para determinada região gênica e o seu par é homozigoto com este alelo em homozigose sendo comum a um dos alelos do primeiro, o que está matematicamente expresso na fórmula abaixo, ou (2) ambos os alelos são compartilhados entre doador e receptor.

$$\% \text{ Quimerismo} = \frac{C}{\left(\frac{A-C}{2}\right) + C} \times 100, \quad \text{onde A é o alelo do receptor, e C e D são os alelos do doador.}$$

Na Figura 5 abaixo, podem ser observados exemplos de Marcadores STRs do Tipo 3, onde: (1) nas 5A e 5B tem-se o primeiro subtipo no qual o doador ou o receptor é heterozigoto para determinada região gênica e o seu par é homozigoto com este alelo em homozigose sendo comum a um dos alelos do primeiro e (2) nas

5C e 5D, o segundo subtipo no qual ambos os alelos são compartilhados entre doador e receptor em heterozigose e homozigose, respectivamente.

Figura 5 - Marcadores STRs Tipo 3 - Doador ou o receptor é heterozigoto para determinado STR, e o seu par é homozigoto com este alelo sendo comum a um dos alelos do primeiro ou ambos os alelos são compartilhados entre doador e receptor.



Fonte: A Autora (2021).

Foram consideradas para o cálculo da porcentagem de Quimerismo apenas as regiões genéticas que apresentaram marcadores STRs dos Tipos 1 e 2, primeiramente de forma isolada para cada região gênica e, ao final, foi realizada uma média aritmética simples de todas as regiões genotipadas, usando a Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea, KimerCalcBR recém desenvolvida no presente estudo.

Embora seja possível calcular a porcentagem de quimerismo dos marcadores STRs do Tipo 3, seguindo as recomendações feitas por Clark *et al* (2014), estas regiões foram excluídas dos cálculos quiméricos por serem mais propensas a erros,

particularmente saturação, uma vez que são baseados em três alelos que co-migram no mesmo local. Os resultados foram expressos em porcentagem de células doadoras: o Quimerismo completo foi definido pela detecção de $\geq 95\%$ das células doadoras e Quimerismo misto por $< 95\%$ das células doadoras.

Análise Estatística

As análises estatísticas e gráficas foram realizadas utilizando o software Python e as bibliotecas Scipy e Matplotlib. A comparação entre as metodologias empregadas foi realizada através do Teste T-pareado uma vez que as amostras são oriundas dos mesmos pacientes. Valores foram considerados estatisticamente significativos para p-value $< 0,05$.

Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea

A implementação dos algoritmos do lado do servidor foi realizada utilizando a linguagem de programação PHP (Hypertext Preprocessor ou Processador de Hipertextos) e a linguagem de script JQuery, na qual foi implementada a biblioteca gráfica Google Graph. Para a interface gráfica, foi utilizado o framework Bootstrap com CSS (Cascading Style Sheets que em português seria algo como “folhas de estilo em cascata”). Todos os algoritmos de cálculos foram implementados segundo a literatura corrente específica para cada caso (Thiede *et al* (1999)). Todos estes softwares são distribuídos sob a licença open-source.

Resultados

Das 71 amostras de sangue coletadas pós transplante, 26 amostras não amplificaram diretamente a partir dos cartões FTA® e cinco amostras amplificadas a partir do DNA extraído, o que corresponde a 36,6% e 7,0%, respectivamente. Dentre as amostras processadas a partir dos cartões FTA® que não amplificaram, a contagem global de leucócitos variou de 10 a 740 leucócitos/mm³ e período pós-TCTH, de D+3 a D+12; em relação às amostras que tiveram DNA extraído e que não amplificaram, a contagem global de leucócitos variou de 10 a 1750 leucócitos/mm³ e período pós-TCTH, de D+3 a D+9. Para ambas as metodologias, não houve repetição dos procedimentos laboratoriais (ver Tabela 04).

Tabela 04: Quantidade de amostras coletadas amplificadas e não amplificadas por metodologia

PACIENTE	Quantidade de Amostras Pós TCTH coletadas			
	Amplificadas		Não-Amplificadas	
	EXTRAÍDAS	FTA	EXTRAÍDAS	FTA
R1	05	02	--	03
R2	06	04	01	03
R3	04	01	--	03
R4	08	05	--	03
R5	06	04	--	02
R6	08	07	02	03
R7	06	03	--	03
R8	09	08	01	02
R9	10	10	--	--
R10	04	01	01	04
TOTAIS	66	45	05	26

Fonte : A Autora (2021)

Dos 10 receptores participantes do presente estudo, apenas dois não possuíam grau de parentesco, enquanto oito possuíam vínculo familiar com seus doadores, sendo seis transplantes entre irmãos e dois entre pai e filha. No grupo de aparentados, como existe compartilhamento de alelos entre o par doador-receptor, espera-se um número reduzido de marcadores STRs dos Tipo 1 (Totamente Informativos) e Tipo 2 (Informativo), ou seja, àqueles utilizados nos cálculos quiméricos do presente trabalho, que variou de 9 a 13 (média de 11.5), quando comparados ao grupo de não-aparentados, no qual espera-se um maior número de alelos não compartilhados, que variou de 20 a 22 (média 21.0). A tabela 03 resume a quantidade de marcadores STRs por Tipo (1, 2 e 3) entre os respectivos pares doador-receptor, bem como a quantidade de marcadores utilizados nas análises quiméricas por Tipo (1 e 2). Não foram levados em consideração os marcadores: da amelogenina, do cromossomo Y e STRs do Tipo 3.

Tabela 2 - Quantidade de marcadores STRs por Tipo (1, 2 e 3) entre os respectivos pares doador-receptor e quantidade de marcadores utilizados nas análises quiméricas por Tipo (1 e 2).

Receptor	Total de Marcador Tipo 1	Total de Marcador Tipo 2	Total de Marcador Tipo 3	Total de Marcadores utilizados nos cálculos quiméricos (Tipos 1 e 2)
R1	--	13	10	13
R2	05	05	13	10
R3	03	10	10	13
R4	--	12	11	12
R5	11	11	01	22
R6	11	09	03	20
R7	04	09	10	13
R8	--	09	14	09
R9	04	08	11	12
R10	02	08	13	10

Fonte: A Autora (2021)

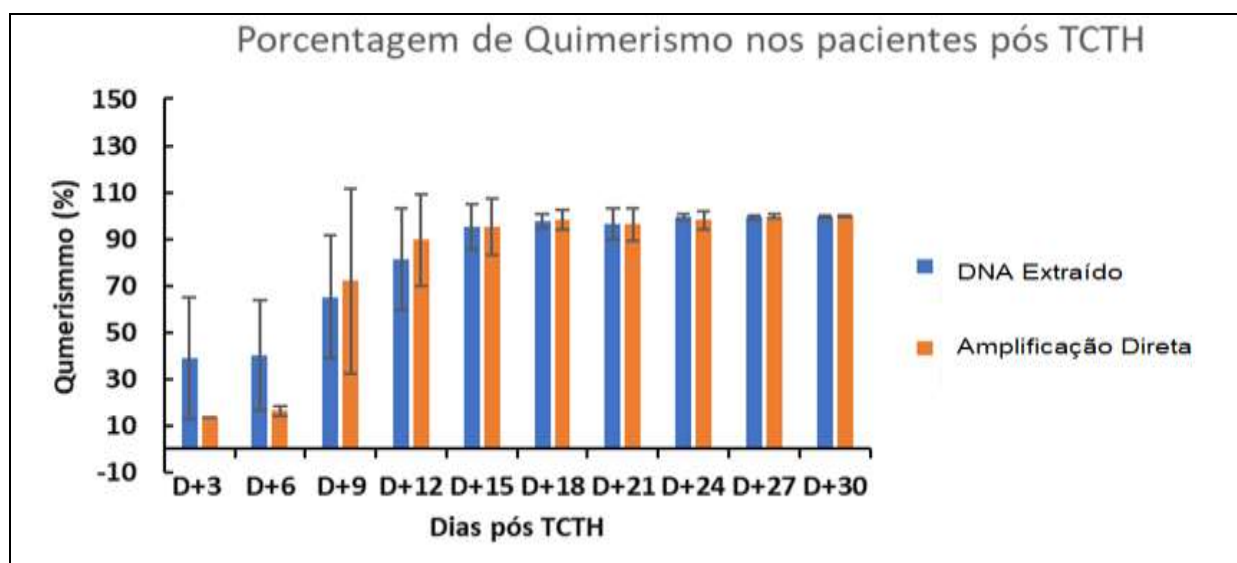
A Tabela 3 mostra a porcentagem das médias do Quimerismo a partir das amostras que tiveram DNA extraído foram de 38,97% em D+3; 40,12% em D+6; 65,18% em D+9; 81,25% em D+12; 95,41% em D+15; 97,59% em D+18; 96,56% em D+21; 99,37% em D+24; 99,28% em D+27 e 99,50% em D+30. A partir das amostras amplificadas de forma direta (FTA®), as médias quiméricas foram 13,6% para D+3; 16,25% para D+6; 71,9% para D+9; 89,65% para D+12; 95,34% para D+15; 98,13% para D+18; 96,2% para D+21; 97,95% para D+24; 99,58% para D+27 e 99,83% para D+30. A comparação destes resultados é feita no Gráfico 1.

Tabela 03 – Porcentagem das médias do Quimerismo por período pós-TCTH por metodologia.

Período Pós TCTH	Amplificação do DNA Extraído	Amplificação Direta (FTA®)
D+3	38,97%	13,6%
D+6	40,12%	16,25%
D+9	65,18%	71,9%
D+12	81,25%	89,65%
D+15	95,41%	95,34%
D+18	97,59%	98,13%
D+21	96,56%	96,2%
D+24	99,37%	97,95%
D+27	99,28%	99,58%
D+30	99,50%	99,83%

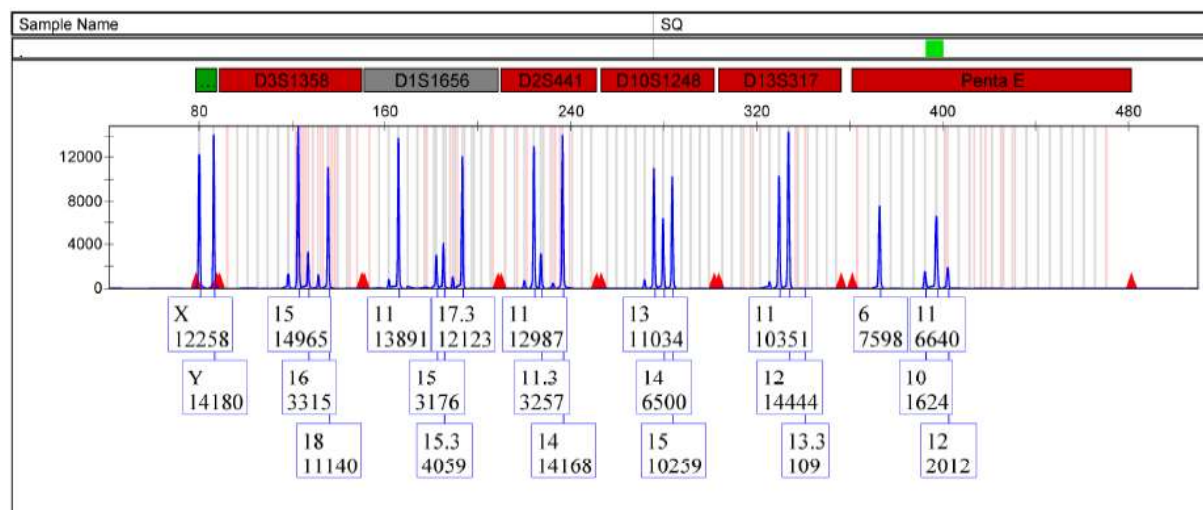
Fonte: A autora (2021).

Gráfico 1: Comparação de Porcentagem Quimérica entre Amostras Extraídas e Amostras Amplificadas Diretamente



Fonte: A autora (2021).

Figura 6 – Exemplo de Quimerismo Misto: 22.2% (Receptor 5 – D+3), pela metodologia do DNA extraído.

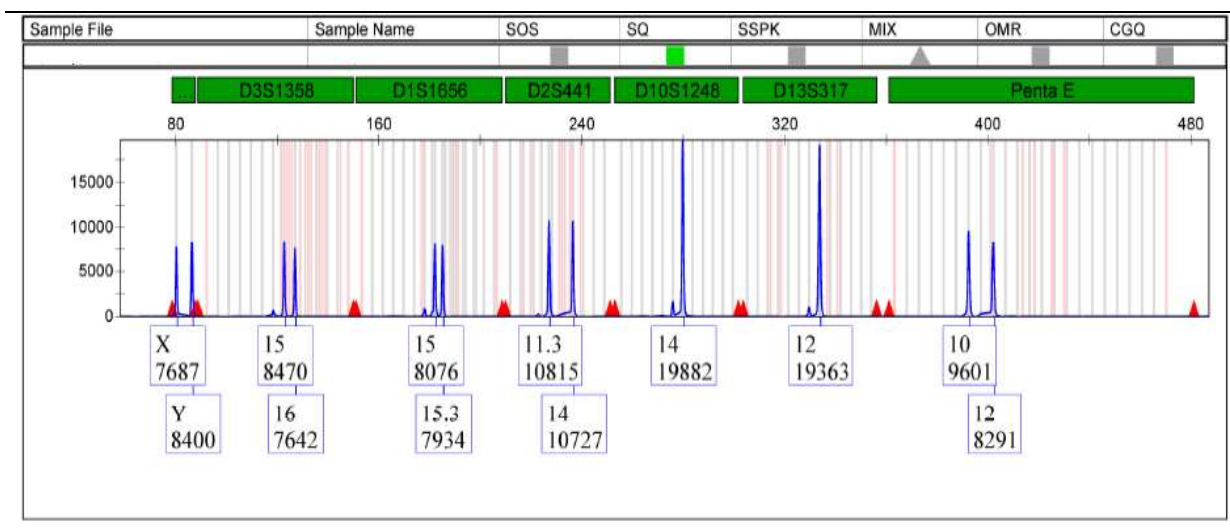


Fonte: A autora (2021).

Na Figura 6 é possível evidenciar o Quimerismo Misto no qual o percentual quimérico, ao ser considerado o eletroferogramam como um todo, é de 22,2%. Por enquanto que, na Figura 7 já é possível observar o Quimerismo Completo com percentual quimérico de 95,5% quando considerado o eletroferograma como um todo. Em ambas as Figuras está representada a primeira linha do eletroferograma do

Receptor 5 nos períodos D+3 e D+9, respectivamente, quando empregada a metodologia da Amplificação do DNA Extraído.

Figura 7 – Exemplo de Quimerismo Completo: 99.5% (Receptor 5 – D+9), pela metodologia do DNA extraído.



Fonte: A Autora (2021).

Na Tabela 4 pode ser observado o dia pós TCTH alogênico no qual ocorreu a Enxertia para todos os pacientes participantes do estudo, bem como a porcentagem quimérica de acordo com a metodologia empregada. Excetuando-se o receptor R7, no qual a Pega Medular ocorreu em D+12 quando realizada a Extração do DNA e D+15 quando procedido por Amplificação Direta, para os demais pacientes, a Enxertia ocorreu no mesmo período para ambos protocolos, com a pega medular ocorrendo em D+15 para 44,4% dos pacientes (n=4), em D+12 para 33,3% dos pacientes (n=3) e 11,1% dos pacientes para D+9 (n=1) e D+27 (n=1).

Tabela 4 – Período de Enxertia por paciente por metodologia empregada.

PACIENTE	DIA PÓS TCTH	QUIMERISMO – Extração de DNA	QUIMERISMO – PCR
			Direta
R1	D+12	98.5	100.0
R2	D+15	96.0	97.9
R3	D+12	99.4	99.7
R4	D+15	100.00	100.0
R5	D+9	99.5	100.0
R6	D+27	97.8	98.3
R7	D+12	94.4	96.5
	D+15	99.9	99.6

R8	D+12	97.2	99.0
R9	D+15	97.1	97.1
R10	D+15	96.4	100.0

Fonte: A Autora (2021)

Os cálculos de Quimerismo de Medula Óssea foram realizados a partir da Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR) desenvolvida e validada neste estudo.

A Tabela 5 resume os metadados obtidos a partir dos prontuários clínicos dos pacientes (idade, gênero, sexo, diagnóstico, tipo de doador, tipo de transplante) bem como os resultados das análises quiméricas (dia da Enxertia pós TCTH e porcentagem quimérica) por ambas as metodologias empregadas no presente trabalho por dia de coleta (DNA Extraído de sangue total e Amplificação Direta de FTA), além da contagem global de leucócitos.

Tabela 5 – Resumo dos Metadados dos Receptores e Resultados das Análises Quiméricas.

RECEPTOR	IDADE (anos)	GENERO	DIAG	TIPO DE DOADOR	TIPO DE TRANSPLANTE	ENXERTIA	%QUIMER	CONTAGEM GLOBAL DE LEUCÓCITOS
R1	6	FEMININO	AAS	APARENTADO (pai)	HAPLOIDÊNTICO	D+12	98.5 - EXTRAÍDO 100,00 - FTA	240/mm3
R2	4	MASCULINO	LLA	APARENTADO (irmã)	ALOGÊNICO	D+15	96.0 - EXTRAÍDO 97.9 - FTA	2.360/mm3
R3	7	MASCULINO	LLA	APARENTADO (irmã)	ALOGÊNICO	D+12	99.4 - EXTRAÍDO 99.7 - FTA	1.270/mm3
R4	60	FEMININO	LMA	APARENTADO (irmão)	HAPLOIDÊNTICO	D+15	100.0 - EXTRAÍDO 100.0 - FTA	570/mm3
R5	8	MASCULINO	LLA	NÃO APARENTADO	ALOGÊNICO	D+9	99.5 - EXTRAÍDO 100.0 - FTA	1.040/mm3
R6	11	MASCULINO	LMC	NÃO APARENTADO	HAPLOIDÊNTICO	D+27	97.5 - EXTRAÍDO 98.3 - FTA	3.590/mm3
R7	35	MASCULINO	LMC	APARENTADO (irmã)	ALOGÊNICO	D+12 D+15	99.9 - EXTRAÍDO 96.5 - FTA	790/mm3 4.310/mm3
R8	44	FEMININO	LAB	APARENTADO (FILHA)	HAPLOIDÊNTICO	D+12	97.2 - EXTRAÍDO 99.0 - FTA	680/mm3
R9	32	MASCULINO	LMA	APARENTADO (irmão)	ALOGÊNICO	D+15	97.1 - EXTRAÍDO 97.1 - FTA	3.280/mm3
R10	33	FEMININO	AAS	APARENTADO (irmã)	HAPLOIDÊNTICO	D+15	96.4 - EXTRAÍDO 100.0 - FTA	320/mm3

Fonte: a Autora (2021)

Discussão

Nesse trabalho, foram confrontados os resultados (porcentagens) dos cálculos do Quimerismo de Medula Óssea de duas metodologias: (1) a partir da extração de DNA de amostras de sangue total coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA, seguida das etapas de quantificação, normatização (1ng/uL), amplificação e

genotipagem e (2) a partir da amplificação direta do DNA de discos circulares de Cartões FTA® sem qualquer pré-tratamento, seguida da etapa de genotipagem. A primeira metodologia é rotineiramente utilizada nos laboratórios que realizam análises de Quimerismo pós-TCTH, podendo haver divergência quanto ao protocolo de extração do DNA; a segunda metodologia ainda não foi descrita na literatura. Atualmente, não existem estudos e/ou protocolos que recomendem e/ou façam o uso de Cartões FTA® como suporte de coleta de sangue total para ser usado em estudos de Quimerismo de Medula Óssea. Usualmente, para esta finalidade, é realizada coleta de 2 a 4mL de sangue em tudo contendo anticoagulante EDTA.

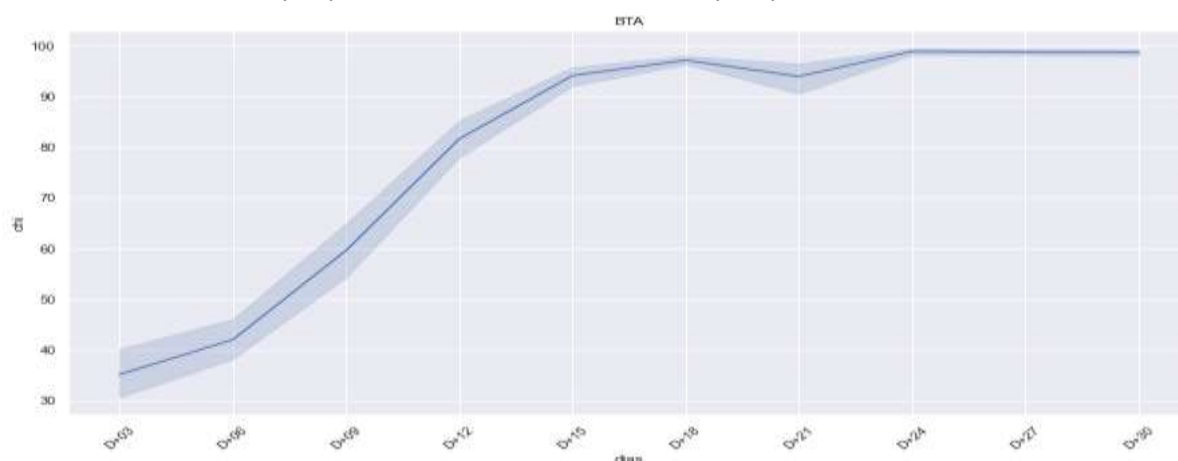
A diferença entre a quantidade de amostras não amplificadas a partir da extração do sangue total em tubo (4 amostras) em relação aquelas que foram extraídas diretamente sem nenhum pré-tratamento (26 amostras) pode ser explicada pelo fato daquelas terem sido quantificadas e normalizadas para 1ng/uL de DNA (de acordo com a orientação do kit *PowerPlex® Fusion 6C System*), tendo input de DNA variando de 15uL a menos de 1uL. No entanto, este fato não é impeditivo e nem invalida o uso dos Cartões FTA® como metodologia a ser aplicada para seguimento do Quimerismo de Medula Óssea porque, normalmente, os laboratórios realizam testes de Quimerismo quando a contagem de neutrófilos atinge $0,5 \times 10^3 / \mu\text{L}$ em três dias consecutivos, o que é suficiente para realizar a PCR direta. Em casos raros, um resultado pode ser necessário quando a contagem de células estiver abaixo desse nível. Em circunstâncias excepcionais, pode ser necessário extrair o DNA de amostras gravemente leucopênicas para maximizar a concentração de DNA. (KRICKE, 2018).

A quantificação da porcentagem do Quimerismo e ocorrência de Enxertia (ou pega medular) foram baseados nas alturas dos picos dos alelos dos receptores e doadores. Neste sentido, foram utilizados os marcadores STRs do Tipo 1 (Totalmente Informativo) e Tipo 2 (Informativo), segundo descrito por Thiede *et al* (1999). Os cálculos quiméricos foram baseados na relação da quantidade de material genético do doador em relação a quantidade de material genético do receptor, sendo o resultado expresso em percentual com uso de três casas decimais para cada STR individualmente e uma casa decimal no resultado final (média aritmética simples de todos os STRs selecionados). O Quimerismo Completo foi definido quando a relação doador/receptor foi $> 95\%$ e Quimerismo Misto quando esta relação foi $\leq 95\%$.

De acordo com os resultados alcançados, até o décimo quinto dias após o TCTH (D+15), 9 dos 10 pacientes participantes havia alcançado a enxertia (ou pega medular), o que corresponde a 88,9%. Estes dados estão em acordo com os resultados obtidos por Qin *et al* (2014) no qual todos os pacientes alcançaram o enxerto de neutrófilos em um tempo médio de 12 dias (variação de 10 a 25 dias). O presente estudo também está compatível com o estudo realizado por Lejman *et al* (2019), em que no dia +14, uma mediana de 90% dos pacientes apresentara, Quimerismo Completo do doador.

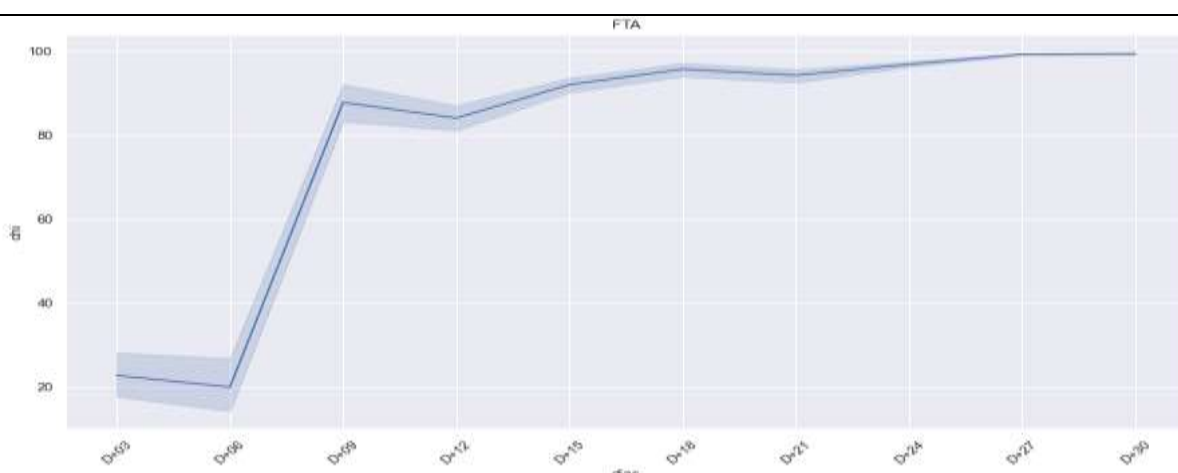
Pelo gráfico 2, percebe-se que o percentual quimérico das amostras extraídas (BTA) cresce de forma regular. Em contrapartida, no gráfico 3, que representa as amostras amplificadas diretamente (FTA®), o percentual quimérico não cresce de forma regular, tendo um crescimento abrupto entre D+6 e D+9.

Gráfico 2 - Quimerismo por período das amostras extraídas (BTA).



Fonte: A Autora (2021)

Gráfico 3 - Quimerismo por período das amostras diretamente amplificadas (FTA®).



Fonte: A Autora (2021)

O Teste T-pareado foi realizado para determinar se houve diferença significativa entre as amostras que passaram pelo processo de extração (BTA) e as amostras que foram amplificadas diretamente (FTA®). A partir de D+12, não houve diferença significativa entre as duas metodologias ($pvalue = 0,371$), o que pode ser constatado na Figura 8.

Figura 8 – Teste T-pareado entre amostras extraídas (BTA) e amostras amplificadas de forma direta (FTA®).

D+3
p-value : Ttest_indResult(statistic=-3.252681752997954, pvalue=0.0012853387365494998)
D+6
p-value : Ttest_indResult(statistic=-6.0224002331090345, pvalue=6.605050094846645e-09)
D+9
p-value : Ttest_indResult(statistic=7.575225700645675, pvalue=8.189089028144363e-13)
D+12
p-value : Ttest_indResult(statistic=0.895443658809124, pvalue=0.371004463961242)
D+15
p-value : 0.20467196516225794

Fonte: A Autora (2021).

Os resultados obtidos por Qin *et al* (2014) e por Navarro-Bailón (2020) corroboram que a técnica de STR-PCR é uma ferramenta útil e confiável para seguimento para Quimerismo de Medula óssea, sendo considerada até os dias atuais a técnica-ouro, apesar de existirem outras metodologias sensíveis, que devido seu alto custo devem ser adotadas de forma excepcional quando a clínica do paciente for altamente indicativa de DRM (NAVARRO-BAILÓN, 2020; PREUNER, 2015; QIN, 2014). Apesar das técnicas de PCR em tempo real destinadas à amplificação de SPs (polimorfismo de sequência) serem superiores ao STR-PCR clássico, nenhum dado clínico adequado confirma que o aumento da sensibilidade na detecção de células hospedeiras residuais melhora a capacidade dos testes de Quimerismo de prever recidiva (QIN, 2014).

O teste do Quimerismo deve ser complementado com ensaios de Doença Residual Mínima, quando disponíveis, embora, em várias doenças (por exemplo, síndromes mielodisplásicas), a detecção da hematopoiese residual do hospedeiro

pelo teste do Quimerismo possa ser um marcador substituto da doença residual. No entanto, a persistência ou reaparecimento das células receptoras também pode refletir a sobrevivência das células hematopoiéticas normais do hospedeiro, e, portanto, é importante monitorar a dinâmica do Quimerismo por análise serial em intervalos regulares (CLARK et al, 2015). O MRD deve ser monitorado usando técnicas de PCR específicas da doença, por exemplo, rearranjo do receptor de células T ou gene Ig para LLA e marcadores de genes como AML1-ETO, CBFBMYH11, NPM1, FLT3 e MLL-PTD para AML (QIN, 2014).

Desempenho da Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR)

A Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR) foi elaborada de acordo com as fórmulas descritas por Thiede *et al* (1999) para os marcadores STRs Tipo 1 (Totalmente Informativo), Tipo 2 (Informativo) e Tipo 3. Ela calcula a porcentagem quimérica de acordo com a altura dos picos em RFUs de cada STR dos Tipos 1 e 2, identificando os não informativos (STRs Tipo 3), e ao final, média aritmética simples dos STRs.

Para o início dos cálculos, foi necessário, inicialmente, inserir os perfis genéticos de referência do par doador-receptor. Estes podem ser importados diretamente do arquivo txt proveniente do software *GeneMapper*® ID-X ou digitados manualmente. Posteriormente, foi inserido o TXT da amostra a ser realizado o cálculo da porcentagem quimérica, indicando qual o dia pós transplante da coleta. A interface de inserção dos dados e a obtenção de resultados foram feitos de acordo com a sequência descrita nas figuras de 9A a 13:

Figura 9A: Inserção do arquivo TXT dos Perfis Genéticos de Referência do par doador-receptor importados diretamente do software *GeneMapper® ID-X (Donor/Receptor Before)*

Fonte: A Autora (2021)

Figura 9B: Digitação dos Perfis Genéticos de Referência do par doador-receptor (*Create genotype file*)

Fonte: A Autora (2021)

Figura 10: Inserção do arquivo TXT, importado diretamente do software *GeneMapper® ID-X*, da

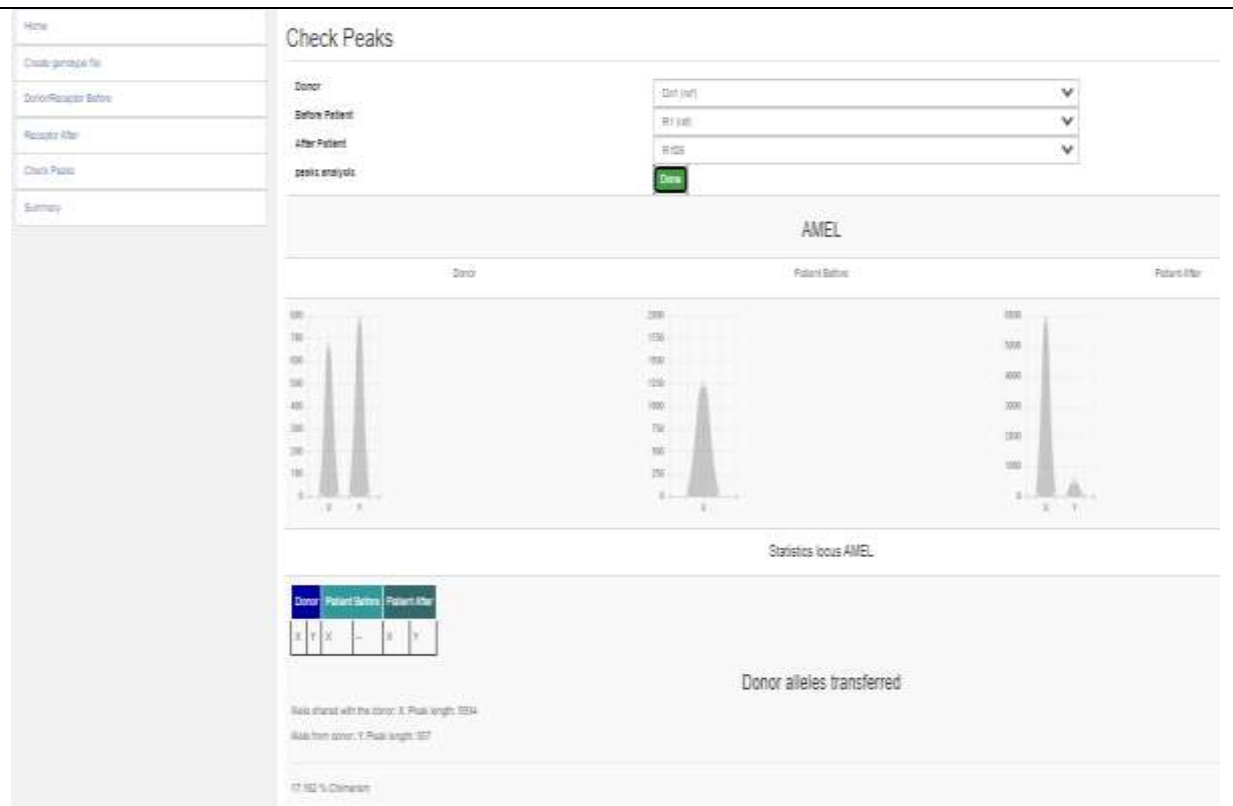
amostra a ser realizado o cálculo da porcentagem quimérica, indicando o dia pós transplante da coleta (*Receptor After*)

The screenshot shows a web application interface titled "Check Peaks". On the left is a sidebar with the following links: Home, Create genotype file, Donor/Receptor Before, Receptor After, Check Peaks (highlighted), and Summary. The main area contains a form with the following elements:

- Donor**: A dropdown menu with "D01 (ref)" selected.
- Before Patient**: A dropdown menu with "R1 (ref)" selected.
- After Patient**: A dropdown menu with "R1D6" selected.
- peaks analysis**: A green button labeled "Done".

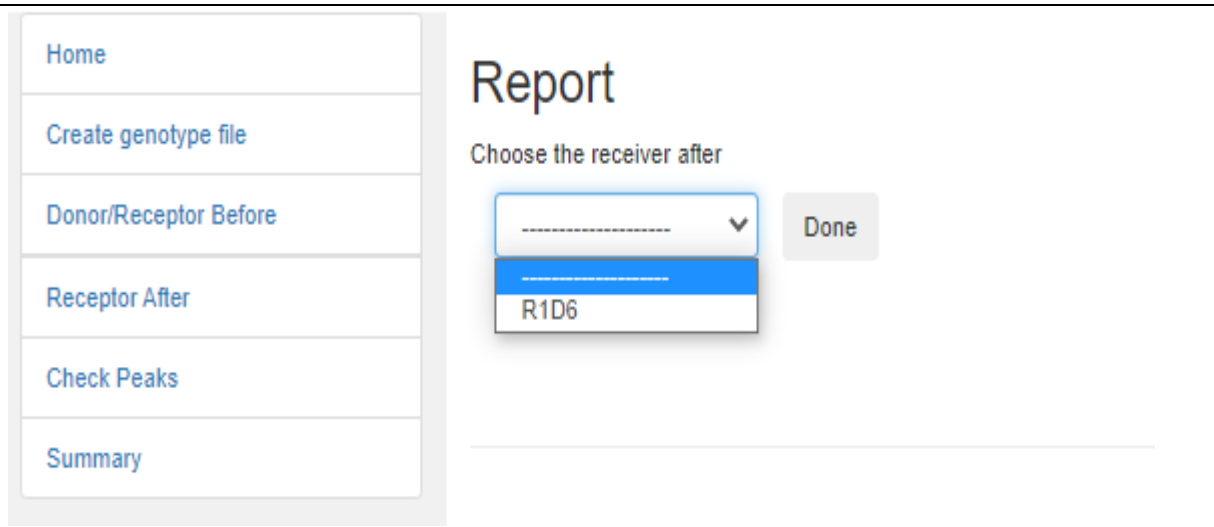
Fonte: A Autora (2021)

Figura 11: A Plataforma calcula a porcentagem quimérica de cada STR separadamente dos Tipos 1 e 2 (*Check Peaks*)



Fonte: A Autora (2021)

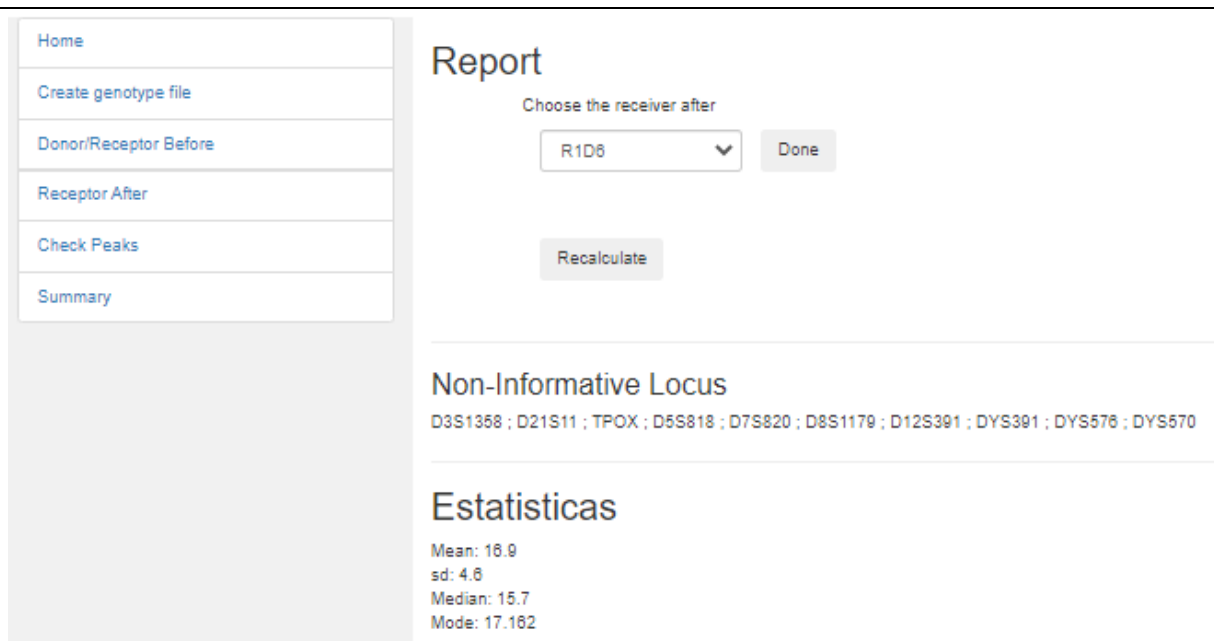
Figura 12: Escolha da amostra, indicando o dia pós transplante da coleta para geração do Relatório Final (*Summary*)



The screenshot shows a web application interface. On the left is a vertical sidebar with a menu containing the following items: 'Home', 'Create genotype file', 'Donor/Receptor Before', 'Receptor After', 'Check Peaks', and 'Summary'. The 'Summary' item is highlighted. The main content area is titled 'Report'. Below the title, it says 'Choose the receiver after'. There is a dropdown menu with a downward arrow, and 'R1D6' is selected and displayed in a blue box. To the right of the dropdown is a 'Done' button. Below these elements is a horizontal line.

Fonte: A Autora (2021)

Figura 13: Cálculo da média aritmética simples das porcentagens químéricas, desvio padrão, mediana e moda dos STRs dos Tipos 1 e 2, além de indicação dos STR Não Informativos (Tipo 3)



The screenshot shows the same web application interface as Figure 12. The 'Summary' item in the sidebar is still highlighted. In the 'Report' section, the 'Choose the receiver after' dropdown menu now shows 'R1D6' in a standard box, and a 'Recalculate' button has appeared below it. Below the 'Recalculate' button is a horizontal line. Under this line, the text 'Non-Informative Locus' is displayed, followed by a list of STRs: 'D3S1358 ; D21S11 ; TPOX ; D5S818 ; D7S820 ; D8S1179 ; D12S391 ; DYS391 ; DYS576 ; DYS570'. Another horizontal line follows. Below this line, the text 'Estatísticas' is displayed, followed by a list of statistics: 'Mean: 16.9', 'sd: 4.6', 'Median: 15.7', and 'Mode: 17.162'.

Fonte: A Autora (2021)

Conclusões

- O tempo mínimo necessário para ocorrência de Enxertia, neste estudo, foi de 9 dias pós TCTH alogênico. 9 dos 10 pacientes participantes alcançaram a

Pega Medular, o que corresponde a 88,9%, entre o décimo segundo e décimo quinto dia pós transplante.

- A partir de D+12, não houve diferença significativa entre as amostras que foram extraídas (BTA) e aquelas que foram amplificadas diretamente (FTA®) com $pvalue = 0,371$. Desta forma, a coleta de sangue total por cartões FTA® podem ser realizadas para análises de seguimento de Quimerismo de Medula Óssea pós-TCTH.
- A Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR), desenvolvida no presente trabalho, contribui para realização de cálculos e análises quiméricas precisas em um menor intervalo de tempo e, conseqüentemente, fornecimento de resultados e redução no tempo de entrega do exame genético.

Perspectivas

- Implementação e validação da Plataforma de Análise e Cálculo de Quimerismo de Medula Óssea (KimerCalcBR): adição de gráficos e dados hematológicos.
- Oferecimento do exame genético de Quimerismo de Medula Óssea pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da UFPE.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho. Houve momentos em que só pensei em sentar, chorar e desistir.

Ao meu gerente e amigo Carlos Souza, por todo apoio, ajuda e incentivo. Foi, com certeza, àquele que me fez dar o primeiro passo da caminhada da minha Dissertação.

Aos meus orientadores Valdir Balbino e Natália Oliveira, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

Às enfermeiras Andréa Maria dos Santos e Wanessa Gomes dos Santos e à assistente social Izabelle Dayane Ramos de Magalhães, todas integrantes do Programa de Transplante de Medula Óssea do Real Hospital Português de

Beneficência em Pernambuco, pela ajuda e pela paciência.

A minha mãe Maria de Lourdes de Oliveira, aos meus filhos Pethrus Jorge de Oliveira Cavalcanti e Victor Gabryel de Oliveira Melo, e a minha comadre Bárbara Keyla Laurindo Gomes, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Referências

BURGOYNE, L.A. Flinders Technologies Pty Ltd. **Solid Medium and Method for DNA Storage**. United States Patent US5496562. 5 de março de 1996.

CARTER, M. E. **Carter Blood On FTA®™ Paper: Does Punch Location Affect The Quality Of A Forensic Dna Profile?** 2012. 169p. Dissertação - Purdue University. Indianapolis, Indiana. Disponível em: http://www.purdue.edu/policies/pages/teach_res_outreach/c_22.htm. Acesso em 13 jun. 2020.

CLARK, J. R. *et al.* United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. **Br J Haematol**. 2015 Jan;168(1):26-37. DOI: 10.1111/bjh.13073. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25145701.

CLEMENTE, I; GONCALO, A; FARIA, C; DIAS, M; BARBOSA, I; MENDES, C. Relevance of Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Transplant Proc**. 2017 May;49(4):890-892. DOI: 10.1016/j.transproceed.2017.01.065. PMID: 28457419.

CONITEC – Comissão Nacional de Tecnologias no SUS. **Imunossupressores pós transplante de medula óssea**. Relatório de Recomendação. Novembro, 2016. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio_Imunossupressao_TransplanteMedulaOssea_CP2016.pdf. Acesso em 06 mai. 2021.

DUMACHE, R. *et al.* Chimerism Monitoring by Short Tandem Repeat (STR) Markers in Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Clin Lab**. 2018 Sep 1 ; 64(9) :1535-1543. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2018.180409. PMID: 30274026.

DUBOIS, V. *et al.* Étude du chimérisme après allogreffe de cellules hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). (Chimerism analysis after hematopoietic cell transplantation: Guidelines from the Francophone Society of bone marrow transplantation and cellular therapy (SFGM-TC)). **Bulletin Du Cancer**, 104(12), S59–S64. DOI:10.1016/j.bulcan.2017.08.010.

Gratwohl, A. *et al.* Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. **Haematologica**. 2013 Aug;98(8):1282-90. DOI: 10.3324/haematol.2012.076349. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23508009; PMCID: PMC3729910.

JIGNAL, P.; SHAIKH MG; DARSHAN, M. Forensic Conception: DNA typing of FTA® Spotted Samples. **J App Biol & Biotechnology** Vol. 2 (04), pp. 021-029, July-August, 2014. DOI: 10.7324/JABB.2014.2404.

KRICKE, S. *et al.* Chimerism Analysis in the Pediatric Setting: Direct PCR from Bone Marrow, Whole Blood, and Cell Fractions. **J Mol Diagn**. 2018 May;20(3):381-388. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.02.003. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29474984.

LEJMAN, M. *et al.* Impact of early chimerism status on clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia after haematopoietic stem cell transplantation. **BMC Cancer**. 2019 Nov 26;19(1): 1141. DOI: 10.1186/s12885-019-6360-3. PMID: 31771553; PMCID: PMC6878687.

MATPLOTLIB, Version 3.4.2. Disponível em <https://matplotlib.org/stable/citing.html>. Acessado em 26 mai 2021.

MERCK. Whatman FTA® card technology. Disponível em: <https://pt.vwr.com/store/product/565085/cartoes-FTA-whatmantm>. Acessado em 06 jul. 2020.

NIST - National Institute of Standards and Technology. **Background Information Regarding Short Tandem Repeats and DNA Typing**. Disponível em: <https://strbase.nist.gov/intro.htm>. Acesso em 22 jul. 2020.

PERNAMBUCO, S. DE S. DE. **Medula: 2,1 mil transplantados em PE**. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-regulacao-em-saude/medula-21-mil-transplantados-em-pe>. Acesso em: 10 abr. 2019.

PERNAMBUCO, S. DE S. DE. **Medula óssea pode ser doada em vida**. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-regulacao-em-saude/medula-ossea-pode-ser-doadada-em-vida>. Acesso em: 08 jul. 2020.

PREUNER, S. *et al.* Risk assessment of relapse by lineage-specific monitoring of chimerism in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute

lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. 2016 Jun;101(6):741-6. DOI: 10.3324/haematol.2015.135137. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26869631; PMCID: PMC5013947.

PYTHON, Versão 3.9.6. The Python Language Reference. Disponível em <https://docs.python.org/3/reference/>. Acessado em 25 mai 2021.

QIN, X.Y. *et al.* Quantitative chimerism: an independent acute leukemia prognosis indicator following allogeneic hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**. 2014 Oct;49(10):1269-77. DOI: 10.1038/bmt.2014.158. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25089597.

REDOME – Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea. **Como é feita a busca por um doador**. Disponível em <http://redome.inca.gov.br/paciente/como-e-feita-a-busca-por-um-doador/>. Acesso em 24 abr 2021

SCIPY: Citing_Scipy. Disponível em https://scipy.github.io/old-wiki/pages/Citing_SciPy.html. Acessado em 25 mai 2021.

SERRANO, J. *et al.* Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. **Blood**. 2000 Apr 15;95(8):2659-65. PMID: 10753848.

SHIMONI A, NAGLER A. Non-myeloablative stem cell transplantation (NST): chimerism testing as guidance for immune-therapeutic manipulations. **Leukemia**. 2001 Dec;15(12):1967-75. DOI: 10.1038/sj.leu.2402316. PMID: 11753620.

SHRIVASTAVA, P.; TRIVEDI, V. B.; SINGH, A. K.; MISHRA, N. Application of DNA fingerprinting technology in forensic investigation. **Int J Sci Res**, Volume 2, Issue 10, October 2012. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.432.7196&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em 22 jul. 2020.

PROMEGA, **Technical Manual. PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers**. Instructions for Use of Products DC2705, DC2720 and DC2780, 2018.

THIEDE, C. *et al.* Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. **Bone Marrow Transplant**. 1999 May; 23(10): 1055-60. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701779. PMID: 10373073.

TSENG, L.H. *et al.* Microsatellite instability confounds engraftment analysis of hematopoietic stem-cell transplantation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 2014 Jul; 22(6): 416-20. DOI: 10.1097/PDM.000000000000029. PMID: 24569786.

PASSWEG, J.R. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more

than 40 000 transplants annually. **Bone Marrow Transplant.** 2016 Jun;51(6):786-92. DOI: 10.1038/bmt.2016.20. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26901709; PMCID: PMC4895175.

6 SÚMULA CURRICULAR

Curso Básico sobre Banco de Dados de DN e a Lei nº 12.654/2012 - 2019.x1. Academia Nacional de Polícia. Período: 16 de abril a 01 de julho de 2019. Carga Horária: 50 horas.

I Workshop em Biossegurança de Transgênicos. Conselho Interno de Biossegurança do Departamento de Genética (ciBIO-dGEN), Universidade Federal de Pernambuco. Período: 15 de Agosto de 2019

Curso de Treinamento da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes. Secretaria de Defesa Social. Período: 26 a 28 de novembro de 2019. Carga Horária: 20 horas.

I Encontro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Mini Curso de Genética Forense (ministrante). Período: 02 a 06 de dezembro de 2019. Carga Horária: 08 horas.

Curso de Coleta de Vestígios Biológicos para Exames de DNA – 2019.x2. Academia Nacional de Polícia. Período: 02 de julho a 31 de março de 2020. Carga Horária: 40 horas.

Treinamento Fluxo de Trabalho em Identificação Humana. Thermo Fisher Scientific. Período: 08 a 11 de outubro de 2020. Carga Horária: 30 horas.

VII Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde. Mesa Redonda (palestrante) intitulada “Ciências Forenses”. Período: 9 a 13 de dezembro de 2019.