

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**AVALIAÇÃO DE MICROQUIMERISMO POR ANÁLISE DE
MICROSSATÉLITES EM PACIENTES SUBMETIDOS À
TRANSFUSÃO SANGÜÍNEA NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Ana Carolina Mardini

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Dissertação de Mestrado

2006

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**AVALIAÇÃO DE MICROQUIMERISMO POR ANÁLISE DE
MICROSSATÉLITES EM PACIENTES SUBMETIDOS À
TRANSFUSÃO SANGÜÍNEA NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Ana Carolina Mardini

Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Dissertação de Mestrado

2006

AGRADECIMENTOS

- A minha chefe e orientadora a Prof. Dr^a Maria Luiza Pereira por ter me ensinado muito sobre pesquisa e maneiras de se “comportar” em um laboratório, e de alguma forma tentou que eu mudasse a minha maneira de me organizar, o que com certeza iria me ajudar em futuros trabalhos;
- Ao meu colega e amigo Rodrigo Rodenbusch que me ajudou bastante nos conhecimentos de biologia molecular e que estava “quase” sempre disponível para me ajudar na leitura dos resultados desse trabalho;
- Aos meus colegas do laboratório de Identificação Genética, André Zoratto Gastaldo e Hugo Bock que de uma maneira ou outra me ajudaram a diminuir o estresse no final deste trabalho;
- A Ursula Matte, por me ajudar no início deste trabalho, e por ter me apresentado pessoas que foram essenciais no auxílio ao desenvolvimento desta pesquisa;
- A querida “ex” colega de laboratório de Biologia Molecular, Bianca Cruz, pelas palavras positivas, amizade e auxílio neste trabalho;
- Ao pessoal do Serviço de Genética Médica do HCPA onde trabalhei por um tempo e principalmente ao pessoal da secretaria onde fiz minhas pesquisas no AGH;
- Ao pessoal do Serviço de Hematologia do HCPA, que me deram livre acesso ao laboratório e pela ajuda, guardando as amostras usadas nesse trabalho;
- Ao pessoal do Banco de Sangue pela disposição, simpatia e gentileza, principalmente da Dr^a Liane Rohsig, da enfermeira Angélica Ghinato e da secretária Marilaine Sá de Castro;
- A minha querida prima Laura Mardini Davi e a minha grande amiga Fernanda Kersting Gomes pela paciência, amizade e por me ensinar alguns segredos da informática;
- Aos meus pais Alfredo Mardini e Diva Fernandes Mardini, pelo amor, paciência e pelo apoio em todas as horas;
- Ao meu irmão Jorge Alexandre Mardini por sempre me ajudar e me apoiar em tudo que eu faço, principalmente na área profissional;

A todos, muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	5
Resumo	6
Abstract	8
1. Introdução	9
2. Revisão da Literatura	10
2.1 Transfusão de Sangue	10
2.1.1 Histórico	10
2.1.2 Hemoterapia	11
a) Hemocomponentes	14
b) Hemoderivados	21
2.2 Microquimerismo	24
2.2.1 Microquimerismo na gravidez e em doenças autoimunes	24
2.2.2 Microquimerismo associado à imunossupressão em transplantes de órgãos e de células tronco	25
2.2.3 Quimerismo e transplante de medula óssea	27
2.2.4 Microquimerismo e cromossomo Y	27
2.3 Análise Molecular de Microquimerismo	29
3. Objetivos	32
4. Referências	33
5. Artigo em português	37
6. Artigo em inglês	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	ácido citrato dextrose
NK	células <i>natural killer</i>
CHL	concentrado de hemácias lavadas
CMV	citomegalovírus
CPD	citrato-fosfato-dextrose
CP2D	citrato-fosfato-dextrose-dextrose
CPDA-1	citrato-fosfato-dextrose-adenina
DNA	ácido desoxiribonucléico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	fator estimulador de colônias granulocíticas
Gy	gray-1joule/Kg
GVHD	doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro (<i>graft-versus-host disease</i>)
HLA-DR	antígenos leucocitários humanos D – relacionados (<i>Human Leukocyte antigen-DR</i>)
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA	antígenos leucocitários humanos (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HTLV 1,2	vírus linfotrópico de célula T humana tipo 1 e 2 (<i>Human T cell Lymphotropic Virus Type 1,2</i>)
ISG	globulina de imunossoro humano
Kg	quilograma
MHC	região do complexo de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
mL	mililitro
PCR	reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction)
PFC	plasma fresco congelado

RESUMO

O microquimerismo vem sendo identificado em uma série de situações biológicas, sendo decorrentes de procedimentos clínicos ou condições fisiológicas. A transfusão sanguínea é um dos procedimentos que pode produzir a mistura de células do doador com as do receptor. Na transfusão sanguínea, o maior constituinte são as hemácias, logo a interferência microquimérica que pode ocorrer deve-se apenas aos leucócitos que são transfundidos do doador. A administração rotineira de produtos derivados do sangue é a principal causa de doenças, aonde estes hemocomponente vindos de doadores alogênicos contém leucócitos capazes de sobreviver e se expandir. Os leucócitos presentes nas bolsas de concentrado de hemácias usados em transfusões sanguíneas podem causar a doença do enxerto *versus* hospedeiro, febre, transmissão viral e interferir na identificação genética do receptor. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em um primeiro momento, o limite de detecção de microquimerismo, através de microssatélites (STRs), em amostras biológicas misturadas em proporções conhecidas e, posteriormente, verificar a presença e o tempo de duração de microquimerismo em pacientes submetidos à transfusão sanguínea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A análise foi realizada a partir de amostras biológicas de três grupos: sete misturas de DNA extraídos antes desse estudo, cinco misturas de sangue e 20 pacientes submetidos à transfusão sanguínea. Todas essas amostras foram também genotipadas individualmente. A genotipagem foi realizada através de PCR seguido por eletroforese capilar, sendo amplificadas as seguintes regiões do genoma: D3S1358, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO, D7S820 e Amelogenina. Os resultados obtidos no grupo de mistura de amostras de DNA foi observada a presença de microquimerismo de 1:30 (ou 3,3%). No grupo de misturas de sangue, microquimerismo foi identificado até a proporção de 1:10 (ou 10%). Entretanto, não foi identificada a presença de microquimerismo em amostras coletadas nas primeiras 24 hs de pacientes submetidos à transfusão sanguínea. Esses resultados sugerem que a metodologia utilizada é sensível para identificar

microquimerismo em misturas biológicas até o limite de 3,3%. Portanto, podemos concluir que o microquimerismo em pacientes transfundidos avaliados nesse estudo não atingiu o limite mínimo de detecção da metodologia empregada nesse trabalho.

ABSTRACT

Microchimerism has been identified in a series of biologic situations, being due to clinical procedures or from physiological conditions. Blood transfusion is a procedure that can produce a mixture of donor and receptor cells. In blood transfusions, where red blood cells are the major component, microchimeric interference is due to donor leukocytes. Even blood cell components previously processed may contain a small portion of leukocytes. In some cases, the routine administration of blood-derived products may be the main cause of diseases⁹ because these hemocomponents from allogeneic donors contain leukocytes capable of surviving and expanding¹⁰. Leukocytes present in bags of red blood cell concentrates used in blood transfusions may cause graft-versus-host disease (GVHD), as well as fever and, viral transmission, and may interfere in the genetic identification of the recipient. This work aimed to evaluate, at first, detection limit of microchimerism, using microsatellites (short tandem repeats - STR), in mixed biological samples of controlled proportions and, later, to verify presence and duration of microchimerism in patients post-blood transfusion in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Analysis was performed in biological samples from three groups: DNA mixtures isolated previously to this study, blood mixtures and patients submitted to blood transfusion. All these samples were also analyzed individually. Allelic patterns were performed through PCR, using fluorescent primers, followed by capillary electrophoresis, with amplification of the following genome regions: D3S1358, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO, D7S820 and Amelogenin. These results in the group of DNA mixtures, microchimerism was observed up to 1:30 (or 3.3%). In the group of blood mixtures, microchimerism was identified up to 1:10 (or 10%). However, presence of microchimerism was not identified in samples collected up to 24 h from patients submitted to blood transfusion. These results suggest that the applied methodology is sensitive to identify microchimerism in biological mixtures up to the limit of 3.3%. Therefore, we can conclude that microchimerism in patients submitted to blood transfusion evaluated in this study did not reach the minimal detection limit for the methodology applied in this work.

1. INTRODUÇÃO

A existência de outras células nucleadas em determinada amostra biológica pode significar a existência de microquimerismo. O microquimerismo pode ser definido como uma pequena população de células ou DNA em um indivíduo, provenientes de um outro indivíduo geneticamente distinto¹⁻⁵.

Na transfusão sanguínea, o maior constituinte são as hemácias, logo a interferência microquímica que pode ocorrer deve-se apenas aos leucócitos que são transfundidos do doador. A administração rotineira de produtos derivados do sangue é a principal causa de doenças⁶, aonde estes hemocomponentes vindos de doadores alogênicos contêm leucócitos capazes de sobreviver e se expandir⁷. Os leucócitos presentes nas bolsas de concentrado de hemácias usados em transfusões sanguíneas podem causar a doença do enxerto *versus* hospedeiro, febre, transmissão viral e interferir na identificação genética do receptor. É estimado que existam cerca de 10^9 leucócitos/unidade de concentrado de hemácias ou plaquetas⁸. A desleucocitação ou irradiação estão entre os procedimentos a que são submetidos os produtos derivados de sangue (hemocomponentes) antes da transfusão.

A análise do DNA é um procedimento de rotina em muitos laboratórios, tanto para o diagnóstico de doenças genéticas, como para outras análises moleculares, como procedimentos de identificação humana e análises forenses. Um dos potenciais problemas nas rotinas desses laboratórios é a análise de DNA em pacientes que fizeram transfusão sanguínea com sangue total, concentrado de hemácias ou outro derivado, que por sua vez contém alguns leucócitos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSFUSÃO DE SANGUE

2.1.1 Histórico

Em 1616, Willian Harvey descreveu a circulação sangüínea, com todas as válvulas, veias e artérias e câmaras internas do coração. Nessa ocasião, ficou comprovado que o sangue é distribuído pelo corpo em um fluxo contínuo e em um único sentido. Inicia-se, então, a história da transfusão sangüínea, como prática com algum suporte científico⁹.

Entre 1665 e 1795 existem registros de transfusão sangüínea de cães para cães e de animais para seres humanos, este último proibido por causar reações transfusionais. Em 1818, James Blundel realiza a primeira transfusão de sangue humano para um paciente em tratamento de hemorragia pós-parto. Entretanto, a medicina transfusional efetiva sua importância no campo médico com a descoberta dos grupos sanguíneos ABO e do sistema RH, por Karl Landsteiner em 1901⁹.

Bancos de sangue e transfusões não se tornaram procedimentos práticos até o desenvolvimento de sistemas anticoagulantes capazes de preservar hemácias numa forma viável. Antes da Segunda Guerra Mundial, quando o sangue era anticoagulado com citrato tri-sódico, as hemácias podiam ser preservadas num estado viável por apenas uma semana devido a falta de fontes de purinas e energia. O primeiro anticoagulante verdadeiramente prático e viável foi o ácido citrato dextrose (ACD), descrito inicialmente em 1943. O ACD contém glicose como fonte de energia e permite o armazenamento de hemácias durante até três semanas¹⁰.

O desenvolvimento de novos anticoagulantes, conservantes sangüíneos e técnicas estéreis permitiram a coleta e a preservação de sangue do doador para uso posterior⁹.

Nas décadas que se sucedem, acentua-se o crescimento em pesquisa e tecnologia, com o desenvolvimento de novas formas de armazenagem do sangue coletado: substituição das garrafas para acondicionamento do sangue por bolsas plásticas resistentes e introdução de testes para controle do sangue coletado para fins terapêuticos¹⁰.

A maioria das doações de sangue hoje é processada de modo a colocar à disposição inúmeros componentes sangüíneos, apenas na situação de uma grande perda sanguínea, é às vezes necessário o uso de “sangue total”. O uso dos componentes do sangue para fins terapêuticos chama-se hemoterapia.

2.1.2 Hemoterapia

A hemoterapia baseia-se na reposição de um tipo de hemocomponente ou hemoderivado que não está presente em quantidade adequada no paciente. Os hemocomponentes e hemoderivados são preparados a partir de sangue colhido de doação de sangue ou doação de aférese.

Uma unidade de sangue total pode ser fracionada para se obter hemocomponentes, como concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma fresco congelado, plasma simples, concentrado de granulócitos e crioprecipitado, e em hemoderivados, como a albumina humana, imunoglobulina endovenosa, fatores de coagulação (VIII e fator IX)¹¹.

A utilização correta dos hemocomponentes, associada a um maior controle de qualidade, desde a coleta, testes laboratoriais, preparação, fracionamento e estocagem, tornou a

hemoterapia segura e, conseqüentemente, muitos pacientes são beneficiados com derivados de sangue em uma única doação¹⁰.

No Brasil, todos os hemocomponentes e hemoderivados se originam da doação de uma unidade de sangue por doador. Esse processo está regulamentado pela portaria nº 1.376 de 19 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde¹¹.

O fracionamento é uma forma de racionalizar a hemoterapia, embora multiplique também os riscos transfusionais. O “**sangue total**”, como é conhecida à unidade de sangue antes de ser fracionada, não encontra hoje quase nenhuma indicação clínica onde não possa ser substituído com eficácia por seus componentes. A preservação clássica de uma unidade de sangue total é um desperdício de componentes e fonte de efeitos indesejáveis. A razão para fracionamento está no fato de ser possível atingir uma melhor conservação dos hemocomponentes isoladamente¹¹.

No Brasil, os testes sorológicos são obrigatórios para as doenças de Chagas, sífilis, hepatite B e C, HIV e HTLV 1-2 e, em regiões endêmicas com transmissão ativa, para malária. Estes testes devem ser de alta sensibilidade, quantitativos, e devem permitir, quando necessário, a automatização do processo. Tais processos devem ser adequadamente formalizados com manuais operacionais, auditorias periódicas e controles internos e externos, por meio de painéis nas áreas de sorologia e imuno-hematologia¹¹.

Todo sangue é coletado em uma bolsa descartável e estéril, de preferência esta bolsa deve ser tripla ou quádrupla, permitindo o fracionamento do sangue em seus hemocomponentes, de forma a garantir a esterilidade e a qualidade. Junto à bolsa são coletadas amostras de sangue para tipagem sangüínea e sorologia. O sangue coletado para doação, apesar dos testes e de todo o processo de triagem clínica, não está isento de risco infecto-contagioso

devido ao fenômeno da janela imunológica, período no qual não se detecta o anticorpo contra o agente infeccioso¹².

No Brasil, pessoas saudáveis entre 18 e 60 anos podem doar sangue, a não ser que pertençam a grupo de risco para transmissão de HIV¹². A frequência das doações é de, no mínimo, dois meses após a última doação para os homens e a três meses para mulheres; isto para respeitar as necessidades individuais e perdas de ferro. O volume retirado em cada doação é de aproximadamente 450ml, não devendo exceder 13% da volemia estimada, e, de acordo com a norma brasileira, não poderá exceder 8ml/kg para as mulheres e 9ml/kg para os homens¹¹.

A bolsa de sangue é adaptada para receber de 405 a 495 ml de sangue e 63 ml de anticoagulante e conservante. A solução anticoagulante-conservante serve para manter a viabilidade e função da célula durante a estocagem. Embora as temperaturas baixas de armazenamento retardem as atividades glicolíticas, as células vermelhas (hemácias) mantêm suas atividades durante a estocagem, consumindo nutrientes e diminuindo a fonte de energia intracelular¹¹.

O FDA (*Food and Drug Administration*) indica 21 dias de estocagem na temperatura de 1 a 6°C para hemácias de sangue total coletados em uma mistura de citrato-fosfato-dextrose (CPD) ou de citrato-fosfato-dextrose-dextrose (CP2D) e de 35 dias para hemácias coletadas em citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1)¹⁰.

De um modo geral, as hemácias transfundidas sobrevivem por longos períodos na circulação do receptor e menos de 1% são destruídas diariamente. A sobrevivência de hemácias alogênicas transfundidas não difere da sobrevivência de hemácias autólogas¹³.

a) Hemocomponentes

Os hemocomponentes são preparados por método de centrifugação diferencial e, usualmente apresentam o mesmo risco de transmissão de doenças do sangue total que os originou, com exceção do citomegalovírus (CMV) e do vírus linfotrópico de célula T humano tipo 1 (HTLV-1). Atualmente, várias metodologias têm sido testadas no sentido de tratar esses hemocomponentes, tendo como objetivo a inativação de patógenos e a diminuição de risco de transmissão de algumas doenças¹⁴.

Dentro dos hemocomponentes (concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma fresco congelado, plasma simples, concentrado de granulócitos e crioprecipitado) há diferenciação na indicação de uso, precauções e modo de armazenamento.

Os **concentrados de hemácias**, parte que contém os glóbulos vermelhos, são utilizados em pessoas com anemia, com grandes hemorragias ou que passaram por cirurgias.

A decisão de transfusão de hemácias deve ser baseada em vários fatores clínicos, tais como: idade do paciente, velocidade de instalação da anemia, história natural da anemia, volume intravascular e a presença de co-fatores fisiológicos que afetam a função cardiopulmonar e a circulação¹³.

O processo de seleção de hemácias para a transfusão envolve dois estágios. No primeiro, o sangue é agrupado ou tipado, o que envolve determinação do grupo ABO e do fator RH, tanto do receptor quanto do doador. No segundo, após a seleção de uma unidade de doação apropriada, um teste de correspondência cruzada é realizado para determinar se as células do doador são de fato compatíveis com o plasma do receptor⁹.

O concentrado de hemácias é obtido a partir de uma unidade de sangue total, da qual é extraída a maior parte do plasma. Se preparado a partir de uma unidade de sangue total coletada em CPD, CP2D ou CPDA-1, o hematócrito deve ser entre 70 a 80% e volume de 200 a 250ml (com 50 a 80ml de plasma). Uma unidade de concentrado de hemácias contém cerca de 10^9 leucócitos¹³.

A dose de concentrado de hemácias vai depender das condições clínicas do paciente. Uma unidade de concentrado de hemácias tem a mesma capacidade de transporte de oxigênio que uma unidade de sangue total, isto é, eleva o hematócrito em 3 a 4% ou 1g/dl de hemoglobina¹³.

No que diz respeito ao concentrado de hemácias, podemos encontrar algumas variações em relação às unidades (bolsas), as quais são classificadas em irradiadas, lavadas ou desleucocitadas.

No caso das bolsas irradiadas, os hemocomponentes são submetidos à irradiação gama, visando prevenir que os linfócitos T viáveis do doador proliferem no receptor e desencadeiem a doença do enxerto *versus* hospedeiro (*graft-versus-host disease*-GVHD). A GVHD apresenta alta mortalidade (90%) e já foi descrita após a infusão de sangue total, concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, concentrado de granulócitos e plasma fresco não-congelado. Para ser eficaz, a dose recomendada de irradiação é de 25Gy (gray-1Joule/Kg) na porção central do hemocomponente¹². O ideal é que a irradiação seja realizada no momento do uso, mas os componentes irradiados que não foram utilizados para um determinado paciente podem ser eficazmente usados para outro. Após a irradiação, ocorre um acúmulo de potássio no sangue irradiado, por isso recomenda-se que hemocomponentes irradiados não sejam estocados, principalmente quando for utilizado para transfusão intra-uterina ou em neonatos. A irradiação inviabiliza os leucócitos por lesão do DNA, impedindo sua divisão no hospedeiro. Este processo, no entanto, é restrito a

pacientes imunocomprometidos, politransfundidos e pacientes pediátricos com sorologia negativa para citomegalovírus¹³.

No caso das bolsas lavadas, o plasma ou elementos que compõem o anticoagulante foram removidos. O uso de concentrado de hemácias lavadas (CHL) é recomendado para pacientes com reações alérgicas graves, pacientes com história de reação anafilática a componentes do plasma e pacientes com anticorpos e antiproteínas plasmáticas, em especial aqueles com deficiência de IgA, que apresentem anticorpos anti-IgA. O concentrado de hemácias lavadas é obtido a partir de um processo de lavagem manual ou automática com 1 ou 2 litros de solução fisiológica (solução de cloreto de sódio 0,9%). Esse processo de lavagem remove a maior parte do plasma, as proteínas plasmáticas, os eletrólitos e os leucócitos ($<5 \times 10^8$ leucócitos/ml), mas não o suficiente para evitar a aloimunização a antígenos leucocitários. Esse procedimento pode ser realizado em qualquer momento dentro do prazo de validade do hemocomponente. O CHL pode conter até 20% a menos de hemácias que o concentrado original¹³.

Nas bolsas desleucocitadas, a maioria dos leucócitos do concentrado de hemácias é removida através de filtros especialmente desenvolvidos para esse fim, restando um número de leucócitos inferior a 5×10^6 leucócitos/unidade (quando utilizados filtros de terceira geração) e contendo pelo menos 85% do total de hemácias do concentrado original. O método de leucorredução pode ser feito antes de estocar o hemocomponente, denominada pré-estocagem, ou por ocasião da liberação do concentrado de hemácias para infusão no paciente, denominada pós-estocagem. Esta última pode ser feita no laboratório ou à beira do leito. A transfusão a beira do leito não deve ser utilizada em pacientes que necessitam rápida infusão de sangue, pois o filtro causa redução no fluxo sanguíneo e não é eficaz nos casos de intolerância ao plasma. Nenhuma solução deve ser adicionada à bolsa de concentrado de hemácias desleucocitadas. O uso destas bolsas é recomendado para as seguintes situações: prevenir reações febris não-hemolíticas; prevenir transmissão de

infecção por CMV; para pacientes que realizarão transplante renal (se for indicado para prevenir aloimunização de antígenos leucocitários humanos - HLA); para transfusão intra-uterina; para prevenir aloimunização HLA em pacientes com doenças hematológicas¹³.

O **concentrado de plaquetas** é utilizado no tratamento de câncer (leucemias), nas quimioterapias, nos transplantes (principalmente os de medula óssea), em pacientes com baixa contagem de plaquetas (trombocitopenia), em distúrbios da função plaquetária ou em pacientes que estão sob sério risco de apresentar sangramento (uso profilático)¹⁴.

As plaquetas promovem uma superfície hemostática na qual ocorrerá a formação da rede de fibrina. Deficiências no número e/ou na função plaquetária podem causar prolongamento no tempo de sangramento. A formação do tampão hemostático resulta da combinação dos processos de adesão, ativação e agregação plaquetária e ativação dos fatores de coagulação¹⁵.

A função plaquetária pode ser afetada por alguns fatores como drogas, doenças hepáticas ou renais, septicemia, aumento da degradação da fibrina, derivação cardiopulmonar e distúrbios da medula óssea. O sangue do indivíduo contém aproximadamente 150 a 400 bilhões de plaquetas por litro e, um terço delas, é captada pelo baço. A meia-vida de uma plaqueta é de aproximadamente nove dias, sendo que um oitavo da massa total de plaquetas é destruída e formada por dia, em constante equilíbrio. Ao optar pela transfusão de plaquetas, vários fatores devem ser considerados, como o grau de trombocitopenia ou disfunção plaquetária, a presença, a intensidade e a localização de sangramento ativo. Analisando esses fatores, as indicações podem ser classificadas em profiláticas ou terapêuticas¹⁵.

Existem dois tipos básicos de componentes plaquetários disponíveis para transfusão: concentrado de plaquetas *standard* (50 a 70 ml) obtido a partir de uma unidade de sangue

total e o concentrado de plaquetas obtido pelo processo de doação exclusiva de plaquetas, conhecidas como aférese de plaquetas ou plaquetaférese¹⁵.

O **plasma**, parte líquida do sangue, é rico em fatores de coagulação e tem a função de fazer o transporte de sais minerais, proteínas e vitaminas para todas as partes do corpo, assim como repor os fatores de coagulação. O plasma também é utilizado em grandes hemorragias, em pacientes com doenças hepáticas e pacientes com queimaduras ou sepsias⁹.

O plasma obtido a partir do fracionamento de sangue total coletado em CPD, CPDA-1 ou CP2D ou por plasmáférese deve ser congelado em temperaturas iguais ou inferiores a -18°C dentro de 8 horas após a coleta de sangue total. Quando preparado em ACD, obtido por aférese, o plasma deve ser congelado dentro de 6 horas e pode ser utilizado por até um ano. Esse processo de congelamento nas primeiras horas de coleta assegura que os fatores de coagulação lábeis (fator V e fator VIII) sejam preservados na concentração normal. O fator VIII é estável em plasma ou crioprecipitado armazenado a -20°C durante um ano¹⁶.

O plasma pode ser classificado em plasma fresco congelado, plasma simples ou plasma em *pool*, tratado com solvente-detergente¹⁶.

O plasma fresco congelado (PFC) é constituído basicamente por 7% de proteínas (entre elas a albumina, as globulinas e os fatores de coagulação) e 2% de carboidratos e lipídios. Contém fatores de coagulação (II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII), fatores anticoagulantes (antitrombina III, proteína C e proteína S) e fibronectina, mas não contém plaquetas. Um miligrama de plasma fresco congelado contém cerca de uma unidade de atividade do fator de coagulação¹⁶.

O plasma simples é usado para a produção de hemoderivados.

As unidades de plasma em *pool* são preparadas com plasma fresco congelado e agrupadas em lotes do mesmo tipo sanguíneo. Esses lotes são tratados com solvente (tri-n-butilfosfato) e detergente (Triton X-100) com o intuito de inativar os vírus com envelope lipídico, como o vírus HIV tipo 1 e tipo 2, HTLV-I/II, o vírus da hepatite B e da hepatite C. Essa técnica não inativa outros vírus, não reduzindo o risco de transmissão de vírus não envelopados (parvovírus b19, hepatite A) e de outros agentes¹⁶. Dentre as vantagens do uso de plasma em *pool* em relação ao PFC está a diminuição do risco na transmissão de vírus com envelope lipídico.

Embora não sejam necessários os testes de compatibilidade, o plasma deve ser grupo ABO compatível.

O **concentrado de granulócitos** é comumente usado em pacientes que fazem uso de quimioterapia e radioterapia agressivas, onde esses pacientes estão sujeitos a períodos prolongados de uma completa agranulocitose. O risco de infecções bacterianas graves aumenta quando a contagem granulocítica cai abaixo de $1,0 \times 10^9/L$ e é ainda maior quando a contagem está abaixo de $0,5 \times 10^9/L$ ⁹. Em pacientes com agranulocitose (neutropenia grave), associada a quadro infeccioso não-responsivo ao tratamento com antibioticoterapia, em disfunções granulocíticas, associada a quadro infeccioso não-responsivo, e em septicemia neonatal, a transfusão de granulócitos pode representar uma arma terapêutica adicional no controle e na prevenção de infecções¹⁷.

O concentrado de granulócitos é obtido por meio de aférese, no qual esse procedimento permite a coleta de dose terapêutica de granulócitos para um paciente adulto, a partir de um único doador. Esse doador deve receber corticosteróides e fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) antes da doação. Devido a rápida diminuição na função dos granulócitos durante o período de estocagem, o concentrado de granulócitos deve ser

infundido o mais breve possível, preferencialmente em até 6 horas e nunca após 24 horas da sua coleta.

Embora seja desejável elevar a contagem de granulócitos em tais pacientes, a transfusão terapêutica efetiva de leucócitos humanos ficou para trás da transfusão de outros elementos do sangue por diversas razões. Entre elas, deve-se considerar que é tecnicamente difícil obter concentrados de granulócitos, pois estas células circulam no sangue em baixas concentrações em comparação com outras células sanguíneas⁹.

O **crioprecipitado** é utilizado na prevenção ou tratamento de hemorragias devido à deficiência ou disfunção de fibrinogênio, em pacientes hemofílicos e em pacientes com a doença de Von Willebrand, sendo preparado por descongelamento e posterior centrifugação de uma unidade de plasma fresco congelado, sendo formado pelo precipitado de alto peso molecular. Uma unidade de crioprecipitado contém aproximadamente 250 mg de fibrinogênio, sendo que o mínimo requerido pela *AABB Standard* é 150 mg¹⁰. Após seu preparo, esse produto tem validade de 12 meses, a partir da data da coleta¹⁸.

O crioprecipitado não é muito usado atualmente por existirem vários produtos no mercado para o uso no tratamento e prevenção de sangramento em pacientes portadores de hemofilia A e hemofilia B e da doença de Von Willebrand, incluindo vários concentrados de fator VIII derivados de *pools* de plasma de diferentes graus de pureza (definido como a atividade específica de fator VIII no produto final) e concentrado de fator VIII recombinante. Esses produtos derivados de *pools* de plasma são geralmente fracionados por um método que consiste na precipitação de várias proteínas plasmáticas em misturas de água-etanol resfriadas (método de Cohn)¹⁸.

b) Hemoderivados

Os hemoderivados são preparados a partir de processos mais complexos (industrialização), utilizando-se *pools* de plasma. Dependendo do método e processamento, apresentam diminuição significativa dos riscos de transmissão de doenças. Os hemoderivados (albumina humana, imunoglobulina, fator VIII e fator XI) possuem diferenças tanto no uso como na forma de armazenamento.

A administração de **albumina humana** em situações clínicas continua controversa. O papel da solução colóide, especificamente a infusão de albumina, no tratamento a pacientes críticos, incluindo pacientes com queimaduras e hipoalbumemia, vem sendo debatido nos últimos 20 anos. As razões para esse debate residem no custo significativo e limitação de disponibilidade do produto, até os possíveis efeitos adversos que a adição de albumina pode causar na função de órgãos críticos e na evolução dos pacientes¹⁴.

A albumina é responsável por 80% da pressão colóide osmótica do plasma, normalmente de aproximadamente 27mmHg. O organismo de um indivíduo adulto de aproximadamente 70Kg armazena cerca de 300g de albumina, sendo que entre 60% e 65% é extravascular, na pele, nos músculos e nos intestinos¹⁴. As funções fisiológicas da albumina são a manutenção da pressão oncótica do plasma e a atividade de ligação e transporte é uma proteína globular altamente solúvel sintetizada no fígado¹⁹. A produção de albumina é feita pelo método de Cohn ou por cromatografia. Além dos testes de triagem sorológica de doadores de plasma, métodos de inativação viral para produção de albumina são também realizados.

A albumina tem meia-vida de 15 a 20 dias e a produção diária, em um adulto normal, é de aproximadamente de 16g. Conseqüentemente, em caso de hemorragia, com perda de 500ml de sangue, somente 12g (4% da albumina corporal total) são perdidos, sendo recuperados em um dia. A albumina pode ser estocada por 3 anos em temperaturas inferiores a 37°C e por 5 anos em temperaturas entre 2 a 10°C¹⁴.

A globulina de imunossoro humano (ISG, *immune serum globulin*) contém um amplo espectro de anticorpos naturalmente presentes na população de doadores. Ela apresenta um valor comprovado na terapia profilática (de reposição) de pacientes com deficiências de imunoglobulinas hereditária ou primária adquirida, mas seu valor na terapia ou prevenção de infecção em pacientes com imunodeficiência humoral secundária a malignidades, como leucemia linfocítica crônica ou mieloma múltiplo, não ficou comprovado. A ISG também tem valor na imunização passiva contra inúmeras doenças infecciosas, como hepatite A, sarampo e varicela, podendo apresentar um certo benefício contra a poliomielite e rubéola⁹.

As imunoglobulinas podem ser encontradas tanto para uso intravenoso como para uso intramuscular. As imunoglobulinas de uso intramusculares são constituídas por mais de 95% de IgG, podendo ter alto peso molecular, o que contra-indica seu uso intravenoso. A imunoglobulina hiperimune de uso intramuscular é utilizada para a prevenção de hepatite B, varicela, raiva, tétano e para imunossupressão de indivíduos Rh-D-negativo que recebem hemácias Rh-D-positivas. A administração das imunoglobulinas para uso intravenoso é o tratamento de escolha nas deficiências imunológicas humorais e tratamento alternativo ou complementar em processos auto-imunes e patologias nas quais as alterações da imunomodulação são partes importantes da fisiopatologia²⁰.

A ISG é preparada a partir de *pool* de plasma, independente da presença de anticorpos específicos. Ela é fornecida em uma solução protéica (16,5%), contendo aproximadamente

9% de IgG e pequenas quantidades de IgA e IgM. As imunoglobulinas podem ser obtidas dos seres humanos, de outros animais e por técnicas de DNA recombinante. As imunoglobulinas obtidas do ser humano podem ser indicadas tanto para o uso intramuscular como para o uso intravenoso e ser ou não hiperimunes, ou seja, conter alto título de anticorpos contra determinada doença²⁰.

Os **fatores VIII e IX** são os concentrados de plasma mais utilizados e tem processamento industrial. Os concentrados de **fator VIII** são utilizados basicamente no tratamento das manifestações hemorrágicas ou na preparação para procedimentos invasivos em pacientes com hemofilia A (deficiência congênita do fator VIII). Os concentrados de **fator IX** são empregados basicamente para o tratamento da hemofilia B (deficiência congênita do fator IX). Os concentrados que contêm ainda os fatores II (protrombina), VII e X (os chamados concentrados de complexo protrombínico) podem ser utilizados nos pacientes que desenvolveram inibidores (anticorpos) para os fatores VIII ou IX, nos pacientes com deficiências congênitas da protrombina ou dos fatores VII ou X. A pureza dos concentrados de fator IX apresenta grande importância prática, visto que está bem documentado que o grau de pureza tem correlação inversa com o desenvolvimento de hipercoagulabilidade²¹.

No banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre é comum a utilização de bolsas de concentrados de hemácias: irradiados ou não-irradiados (usados geralmente em cirurgias), desleucocitadas e lavadas.

2.2 MICROQUIMERISMO

O microquimerismo pode ser definido como uma pequena população de células ou DNA em um indivíduo, provenientes de um outro indivíduo geneticamente distinto¹. Em algumas circunstâncias, como na gravidez, em casos de transfusão de sangue e em transplantes, pode ocorrer tráfico de células de um indivíduo para outro²². No caso da transfusão de sangue, as células do doador encontram-se misturadas às do receptor na circulação.

O microquimerismo vem sendo investigado em várias doenças com alguns resultados indicativos de um papel em potencial na patogenia de doenças². As descobertas de transferência, persistência e diferenciação presumida de células microquiméricas em diversos tecidos, introduziram uma reavaliação considerando o papel dessas células em pessoas saudáveis e doentes. Fatores genéticos, exposições ambientais (produtos químicos tóxicos, drogas e infecções), imunossupressão e algumas doenças são possíveis fatores que influem no microquimerismo²².

2.2.1 Microquimerismo na gravidez e em doenças autoimunes

O microquimerismo ocorre durante a gravidez e pode persistir na mãe após o nascimento⁴. A transferência natural das células microquiméricas indica que o tráfico de células que ocorrem entre o feto e a mãe durante a gravidez é bidirecional, sendo que essa troca celular começa a partir da 4ª semana de gestação⁴.

Alguns estudos indicam que tanto células do feto como DNA fetal livre passam para a circulação sanguínea materna rotineiramente durante a gravidez e que microquimerismo

pode ser identificado na circulação materna anos após o fim da gravidez³. A ocorrência de microquimerismo também pode ocorrer intra-útero entre gêmeos¹.

Um número maior de células fetais são transferidas para circulação materna do que células maternas para circulação fetal. O número de células fetais na circulação materna pode ser imprescindível para estabelecer e manter a gravidez. Se for insuficiente o número de células fetais na circulação materna pode ocorrer aborto e células fetais em excesso podem gerar complicações na gestação e predispor a mulher a doenças autoimunes⁴.

A detecção de células fetais na circulação materna tem significado clínico, como a aplicação em diagnósticos pré-natais não-invasivos. Essa detecção pode ser usada para determinar o sexo fetal e como método auxiliar na investigação de doenças hereditárias⁴.

Vários estudos têm investigado o papel do microquimerismo fetal adquirido em mulheres com doenças autoimunes, tireoidite, cirrose biliar primária, síndrome de Sjögren, Lupus eritematoso sistêmico e dermatomiosites¹. O microquimerismo também está associado com doenças não-autoimunes como erupções polimórficas na gravidez, pré-eclampsia, hepatite infecciosa, doença da tireóide não-autoimune, leucemias e câncer cervical²².

Enquanto o conceito de microquimerismo contribui para explicação de algumas doenças autoimunes, outros estudos têm mostrado que microquimerismo adquirido naturalmente entre feto e mãe são comuns em indivíduos saudáveis¹.

2.2.2 Microquimerismo associado à imunossupressão em transplantes de órgãos e de células tronco

O termo quimerismo foi rapidamente introduzido na área clínica no transplante de células tronco e os estudos nessa área tiveram a importância de avaliar a hematopoiese e/ou da

persistência de várias células do doador no receptor, o que foi um importante aspecto no transplante de células tronco²³.

A procura de microquimerismo após período pós-transfusional em receptores de transplantes de órgãos humanos fez com que surgisse a hipótese de que este fenômeno poderia ter uma importância significativa na indução e/ou manutenção da tolerância do órgão transplantado. Existem ainda dúvidas se o microquimerismo é meramente um fenômeno de importância clínica ou se está diretamente relacionado à tolerância do órgão transplantado, o que ainda é um assunto de intenso debate⁵.

Embora diversos agentes imunossupressores tenham sido desenvolvidos, seu uso leva a um grande número de efeitos colaterais e complicações. A identificação de estratégias para a indução da tolerância em transplante clínico é desejável. A variedade de procedimentos, incluindo a transfusão de sangue ou o transplante de medula óssea, foi usada para induzir tolerância aos órgãos transplantados. Entretanto, o sucesso destes imunossupressores foi limitado e amplamente debatido. A troca de leucócitos migratórios entre o órgão transplantado e o receptor (microquimerismo), é uma das iniciativas de criar tolerância ao enxerto, e isto pode levar a retirada ou a redução da imunossupressão²⁴.

O mecanismo para indução de imunossupressão ainda não foi identificado, mas algumas investigações laboratoriais demonstram várias alterações nas funções imunes após a transfusão sangüínea alogênica. O estabelecimento de microquimerismo está sendo considerado um possível mecanismo imunomodulatório. Isto inclui decréscimo no número de células NK (células *natural Killer*), células T-citotóxicas, aumento nos níveis de células CD4 e CD8, linfócitos B e a expressão HLA-DR nos linfócitos⁷.

O microquimerismo hematopoiético foi demonstrado após o transplante de fígado, rins, coração e pulmão, utilizando métodos baseados na reação em cadeia da polimerase

(*polimerase chain reaction* – PCR), tanto pela amplificação do cromossomo Y como na região HLA-DR do complexo de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC)²⁵.

2.2.3 Quimerismo e transplante de medula óssea

O transplante de medula óssea alogênica é uma modalidade de terapia para muitos pacientes com leucemia ou anemia aplástica. O sucesso desta terapia está associado com o estabelecimento do quimerismo²⁶. O desenvolvimento do quimerismo após esse transplante é primordial para o sucesso do mesmo²⁵.

A detecção antecipada do quimerismo no transplante de medula óssea é importante para prever a GVHD, na rejeição da medula óssea e na recaída da doença residual²⁷.

Alguns trabalhos avaliaram se quimerismo poderia ser usado no prognóstico da recaída, já que o quimerismo é freqüentemente observado após o transplante alogênico de medula óssea. Alguns pesquisadores relataram uma boa correlação entre o quimerismo e a doença residual mínima e, subseqüentemente, recaída, enquanto outros não acharam tantas evidências. Portanto, os resultados obtidos foram controversos²⁷.

2.2.4 Microquimerismo e o cromossomo Y

Alguns pesquisadores identificaram DNA masculino ou células masculinas em mulheres como demonstração de microquimerismo. Os resultados desses estudos evidenciam o microquimerismo fetal em mulheres com gravidez prévia de um feto masculino ou, em transplantes, de doadores homens em mulheres receptoras¹.

O DNA masculino pode ser detectado por reação em cadeia da polimerase (PCR) onde é amplificada a seqüência específica do cromossomo Y¹. Essa identificação pode ser realizada no sangue materno a partir da 6ª semana de gestação²².

O microquimerismo de células masculinas não é incomum em mulheres sem filhos. Além de ser conhecido na gravidez, há outras fontes de microquimerismo de células masculinas incluindo abortos espontâneos, perda de gestação gemelar de um feto do sexo masculino ou transferência de células de um irmão mais velho através da circulação materna²⁸.

Por fim, a presença de células masculinas em fígado de mulheres com cirrose hepática biliar aumenta a possibilidade de que o microquimerismo de células fetais pode estar envolvido na patogênese desta doença crônica de fígado²⁹.

2.4 ANÁLISE MOLECULAR DE MICROQUIMERISMO

A análise de microquimerismo em pacientes que fizeram transfusão sangüínea é realizada através de diversas técnicas que se baseiam na presença de células do doador na corrente sangüínea do receptor. Análise citogenética, hibridização fluorescente *in situ* e metodologias baseadas em PCR são algumas dessas técnicas utilizadas na detecção do microquimerismo³⁰. Eventualmente, a utilização de um único teste pode não ser suficiente para a demonstração desta condição, sendo necessária a confirmação através de mais de uma metodologia, dependendo da sensibilidade da mesma²⁴.

As metodologias que utilizam PCR se baseiam, em geral, na análise de regiões polimórficas. Essas regiões conferem a variabilidade dos organismos, em especial em seres humanos. Quanto mais polimórficos forem os *loci* analisados mais informativos serão em relação à identificação individual. Portanto, a análise destes polimorfismos constitui-se uma ferramenta poderosa para distinguir geneticamente os indivíduos ou determinar níveis de relacionamento familiar³¹.

Alguns polimorfismos do genoma humano podem ser decorrentes da inserção ou deleção de nucleotídeos ou segmentos de DNA em posições aleatórias da molécula. Os experimentos de Jeffrey's e colaboradores (1985) descreveram a ocorrência no genoma humano de regiões hipervariáveis caracterizadas por apresentar seqüências de nucleotídeos repetidas consecutivamente (*in tandem*)³¹.

O genoma humano é formado por diferentes tipos de seqüências repetitivas, que compõem cerca de 50% do genoma. As repetições *in tandem* estão espalhados por todos os organismos desde as bactérias aos seres humanos³².

Um dos tipos de polimorfismos verificados em regiões constituintes do genoma humano são os números variáveis de repetições *in tandem* (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTRs), conhecidos como minissatélites, e as repetições curtas em seqüência (*Short Tandem Repeats* - STRs) são conhecidas como microsatélites. Os VNTRs apresentam uma unidade de repetição que varia em torno de 10 a 80 nucleotídeos com fragmentos de tamanhos entre 350 a 1000 pares de bases (pb). Os STRs estão espalhados por todo o genoma humano e são altamente polimórficos, curtos, com unidades de repetição entre 3 a 7 nucleotídeos³³.

Os polimorfismos do tipo microsatélites (ou STRs) podem ser analisados através da PCR, amplificando o DNA a partir de oligonucleotídeos situados nas regiões adjacentes (não repetitivas) a esses polimorfismos³⁴. Em geral, essas análises são desenhadas para amplificar fragmentos entre 100 a 300 pb.

A utilização de marcadores do tipo STRs é um dos métodos de escolha na análise forense, no mapeamento cromossômico, em testes de paternidade, no diagnóstico pré-natal e, também, pode auxiliar no diagnóstico clínico. Nessa área, a avaliação de quimerismo pós-transplante através dessa metodologia é de grande valia, especialmente em procedimentos entre indivíduos do mesmo sexo²⁶.

A PCR se tornou o primeiro método analítico para estudos de microquimerismo e é conhecido por ser altamente sensível, mas essa sensibilidade pode ficar comprometida quando o teste é usado em amostras em que o receptor tenha a base genética similar à do doador³⁵.

A sensibilidade média da detecção de populações de células em menor quantidade (secundárias) usando diferentes marcadores de microsatélites está na faixa de 1 a 6%,

dependendo do marcador individual, do comprimento do fragmento de PCR e da diversidade alélica do mesmo³⁶.

Atualmente, a eletroforese capilar conduziu aplicações mais freqüentes na quantificação de produtos de PCR para a análise de quimerismo. Demonstrando alta sensibilidade e acurácia na detecção do microquimerismo *in vitro* e *in vivo*³⁶.

5. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar, em pacientes transfundidos, a presença de microquimerismo do material genético do doador em amostras de sangue periférico do receptor.

Específicos

- Determinar os alelos de seis microssatélites (STRs) em amostras biológicas (DNA e sangue), tanto individuais como em misturas em proporções conhecidas;
- Estabelecer o limite de detecção de microquimerismo em amostras misturadas de DNA e sangue em proporções conhecidas;
- Verificar a presença e o tempo de duração de microquimerismo em pacientes submetidos à transfusão sanguínea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

6. REFERÊNCIAS

1. Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: An Investigative Frontier in Autoimmunity and Transplantation. *JAMA* 2004 March 3; 291(9): 1127-31.
2. Lambert L, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmunity Reviews* 2002; 2: 133-9.
3. Lambert NC, Dennis lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulation DNA? A quantitative answer. *Blood* 2003; 100(8): 2845-51.
4. Arlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 1-8.
5. McDaniel HB, Yang M, Sidner RA, et al. Prospective study of microchimerism in transplant recipients. *Clin Transplantation* 1999, 13: 187-92.
6. Adams PT, Robertson DD, David AR, Reardon DA, Roth MS. Detection of circulation donor white blood cell in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 1992; 80: 551-5.
7. Flesland O, Lisa SKIp, Storlien AS, Spurkland A, Larsen J, Solheim BG. Microchimerism in immune competent patients related to the leucocytes content of transfused red blood cell concentrates. *Transf Apher Sci* 2004; 31: 173-80.
8. Gong MNg, Sai Y, Zhou W, Thompson BT, Xu L, Christiani DC. Genotyping patients with recent blood transfusions. *Epidemiology* 2003; 14: 744-7.
9. Schroeder ML, Rayner HL. Transfusão de Sangue e dos Componentes Sanguíneos. In: Lee RL, Bithel TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, editors. *Wintrobe: Hematologia Clínica*. 9th ed. São Paulo: Manole; 1998. P. 708-37.
10. Brecher M, editors. Blood transfusion Practice. In: *The AABB Technical Manual*. 14th ed. 50th Anniversary. Bethesda: American Association of Blood Bank; 2003.
11. Dorlhiac-Ilacer, PE. Doação de Sangue e testes laboratoriais no sangue do doador. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, PE, editores. *Manual de transfusão sanguínea*. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 1-8.

12. ANVISA. Regulamento Técnico para procedimentos de hemoterapia. Diário Oficial da União, nº 120 seção 1; resolução nº123, 2005.
13. Novaretti, MCZ; Fontes, BMO. Transfusão de concentrado de hemácias e sangue total. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, PE, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 34-52.
14. Langhi Junior, DM. Hemocomponentes e hemoderivados. Principais indicações. In: Zago, MA; Falcão, RP; Pasquini, R, editores. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001. P. 1001-13.
15. Gomes, EFP; Albiero, AL. Transfusão de Plaquetas. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, P. E, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 53-65.
16. Novaretti, CZ; Jorge, CR. Transfusão de plasma. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, P. E, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 67-74.
17. Mendrone AJ. Transfusão de Granulócitos. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, P. E, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P.81-85.
18. Villaça MPR. Transfusão de Crioprecipitado. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, P. E, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P.75-9.
19. Serinolli, MI; Novaretti, MCZ. Transfusão de Solução de Albumina. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, PE, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 87-94.
20. Dorlhiac-Ilacer, PE; D'Amico EA. Transfusão de Imunoglobulinas. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, PE, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 95-100.

21. D'Amico EA. Transfusão de Concentrado de Fator VIII e IX. In: Chamone, DAF; Novaretti, MCZ; Dorlhiac-Ilacer, PE, editores. Manual de transfusão sanguínea. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2001. P. 101-5.
22. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and the other disorders. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3: 454-63.
23. McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M. Hemotopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transf Apher Sci* 2005; 32: 55-61.
24. Sahota A, Yang M, McDaniel HB, Sidner RA, Book B, Barr R, et al. Evaluation of seven PCR-Based assays for the analysis of microchimerism. *Clin Biochem* 1998; 31(8): 641-5.
25. Carter AS, Bunce M, Cerundolo L, Welsh KI, Morris PJ, Fuggle SV. Detection of microchimerism after allogeneic blood transfusion using nested polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): A caution tale. *Blood* 1998; 92(2): 683-9.
26. Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the Polymerase Chain Reaction. *Blood* 1991; 77(11): 2504-14.
27. Grubic Z, Stingl K, Jelcic EC, Zunec R, Kastelan A, Seiwert RS, et al. Repetitive DNA polymorphism in following chimerism after allogenic bone marrow transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19: 586-590.
28. Yan Z, Lambert N, Guthrie KA, Porter AJ, Loubiere LS, Madeleine MM, et al. Male microchimerism in women with sons: Quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med* 2005; 118: 899-906.
29. Fanning PA, Jonsson JR, Clouston AD, Edwards-Smith C, Balderson GA, Macdonald GA, et al. Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 690-5.

30. Gleissner B, Blau IW, Sindram A, Reinhardt R, Knauf W, Thiel E. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab Haem.* 2001; 23: 401-6.
31. Decorte R, Cuppens H, Maynen O, Cassiman J. Rapid Detection of Hypervariable Regions by the Polymerase Chain Reaction Technique. *DNA and cell Biol* 1990; 9: 461-9.
32. Näslund K, Saetre P, Salomé JV, Bergström TF, Jareborg N, Jazin E. Genome-wide prediction of human VNTRs. *Genomics* 2005; 85: 24-35.
33. McPherson MJ, Moller SG. Genome analysis. In: *PCR the basics*. New York: Bios Scientific Publisher Limited; 2000. P. 241-65.
34. Weir BS. Independence of VNTR alleles defined as fixed bins. *Genetics* 1992; 130: 873-87.
35. Reed WF, LeeT-H, Trachtenberg E, Vinson M, Busch MP. Detection of microchimerism by PCR is a function of amplification strategy. *Transfusion* 2001; 40: 39-44.
36. Spyridonidis A, Zeiser R, Wäsch R, Bertz H, Finke J. Capillary electrophoresis for chimerism monitoring by PCR amplification of microsatellite markers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19: 350-6.

7. ARTIGO EM PORTUGUÊS

AVALIAÇÃO DE MICROQUIMERISMO POR ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES EM PACIENTES SUBMETIDOS À TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

Título curto: microquimerismo em pacientes transfundidos.

Ana Carolina Mardini¹, Rodrigo Rodenbusch¹, Maria Helena Albarus¹, Simone Schumacher¹, Ursula Matte², Roberto Giugliani^{1,2,3}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,4}.

¹Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisas – HCPA; ²Serviço de Genética Médica – HCPA; ³Depart. de Genética e ⁴Depart. de Bioquímica – UFRGS – Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD
Laboratório de Identificação Genética - Centro de Pesquisas
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil
Tel: + 55 51 21018011
Tel: + 55 51 21018010
e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Artigo redigido conforme as normas da Revista Transfusion.

RESUMO

Introdução: O microquimerismo vem sendo identificado em uma série de situações biológicas, sendo decorrentes de procedimentos clínicos ou condições fisiológicas. A transfusão sangüínea é um dos procedimentos que pode produzir a mistura de células do doador com as do receptor. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em um primeiro momento, o limite de detecção de microquimerismo, através de microssatélites (STRs), em amostras biológicas misturadas em proporções conhecidas e, posteriormente, verificar a presença e o tempo de duração de microquimerismo em pacientes submetidos à transfusão sangüínea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Métodos:** A análise foi realizada a partir de amostras biológicas de três grupos: sete misturas de DNA extraídos antes desse estudo, cinco misturas de sangue e 20 pacientes submetidos à transfusão sangüínea. Todas essas amostras foram também genotipadas individualmente. A genotipagem foi realizada através de PCR seguido por eletroforese capilar, sendo amplificadas as seguintes regiões do genoma: D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820 e Amelogenina. **Resultados:** No grupo de mistura de amostras de DNA foi observada a presença de microquimerismo de 1:30 (ou 3,3%). No grupo de misturas de sangue, microquimerismo foi identificado até a proporção de 1:10 (ou 10%). Entretanto, não foi identificada a presença de microquimerismo em amostras coletadas nas primeiras 24 hs de pacientes submetidos à transfusão sangüínea. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que a metodologia utilizada é sensível para identificar microquimerismo em misturas biológicas até o limite de 3,3%. Portanto, podemos concluir que o microquimerismo em pacientes transfundidos avaliados nesse estudo não atingiu o limite mínimo de detecção da metodologia empregada nesse trabalho.

Palavras chaves: microquimerismo, transfusão sangüínea, STRs

ABSTRACT

Background: Microchimerism has been identified in a series of biologic situations, being due to clinical procedures or from physiological conditions. Blood transfusion is a procedure that can produce a mixture of donor and receptor cells. This work aimed to evaluate, at first, detection limit of microchimerism, using microsatellites (short tandem repeats - STR), in mixed biological samples of controlled proportions and, later, to verify presence and duration of microchimerism in patients post-blood transfusion in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Study design and methods:** Analysis was performed in biological samples from three groups: DNA mixtures isolated previously to this study, blood mixtures and patients submitted to blood transfusion. All these samples were also analyzed individually. Allelic patterns were performed through PCR, using fluorescent primers, followed by capillary electrophoresis, with amplification of the following genome regions: D3S1358, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO, D7S820 and Amelogenin. **Results:** In the group of DNA mixtures, microchimerism was observed up to 1:30 (or 3.3%). In the group of blood mixtures, microchimerism was identified up to 1:10 (or 10%). However, presence of microchimerism was not identified in samples collected up to 24 h from patients submitted to blood transfusion. **Conclusion:** These results suggest that the applied methodology is sensitive to identify microchimerism in biological mixtures up to the limit of 3.3%. Therefore, we can conclude that microchimerism in patients submitted to blood transfusion evaluated in this study did not reach the minimal detection limit for the methodology applied in this work.

Key words: microchimerism, blood transfusion, STR

INTRODUÇÃO

Microquimerismo pode ocorrer em uma série de situações biológicas, tanto fisiológicas como decorrentes de procedimentos realizados na prática clínica. Muitas vezes, em uma determinada amostra biológica, células nucleadas provenientes de outro indivíduo, geneticamente distinto, podem ser encontradas (microquimerismo)¹⁻⁵. Essa situação pode ocorrer em casos de transplantes de medula óssea, de transplante de órgãos, na gravidez e nas transfusões sanguíneas, situações em que, durante um determinado período, existe a co-existência de células do doador na circulação sangüínea do receptor⁶. Em casos de transplantes de órgãos, o microquimerismo vem sendo associado à indução e/ou manutenção da tolerância do órgão transplantado⁵, onde a troca de leucócitos migratórios entre o órgão e o receptor é uma das iniciativas de criar tolerância ao enxerto⁷. A presença de quimerismo após transplante de medula óssea é primordial para o sucesso do transplante⁸. Na gravidez, as células quiméricas ocorrem pelo tráfico bidirecional entre as células da mãe e do feto⁴. Além disso, a ocorrência de microquimerismo fetal e materno está associada a doenças autoimunes¹.

Na transfusão sangüínea, situação em que o maior constituinte são as hemácias, a interferência microquimérica é decorrente dos leucócitos do doador. Mesmo os componentes celulares sangüíneos previamente tratados podem conter uma pequena porção de leucócitos. Em alguns casos, a administração rotineira de produtos derivados do sangue pode ser a principal causa de doenças⁹, onde estes hemocomponentes vindos de doadores alogênicos contêm leucócitos capazes de sobreviver e se expandir¹⁰. Os leucócitos presentes nas bolsas de concentrado de hemácias usados em transfusões sanguíneas podem causar a doença do enxerto versus hospedeiro, febre, transmissão viral e interferir na identificação genética do receptor. Estudos prévios estimaram a presença de cerca de 10^9 leucócitos por unidade de concentrado de hemácias ou de plaquetas¹¹.

A análise do DNA é uma rotina em muitos laboratórios mundialmente, sendo utilizada não apenas em identificação humana e na medicina forense, como para a avaliação molecular visando a identificação de predisposições genéticas e o diagnóstico de doenças hereditárias. Um dos potenciais problemas nas rotinas desses laboratórios é a análise em pacientes que foram transfundidos recentemente, especialmente com sangue total, concentrado de hemácias ou outro derivado que contenha uma pequena proporção de leucócitos.

Alguns trabalhos realizados previamente avaliaram metodologias distintas de monitoramento de microquimerismo em situações específicas. Esses trabalhos demonstraram resultados distintos, dependendo do tipo de amostra/pacientes avaliados bem como do grau de sensibilidade da técnica aplicada em cada situação.

Nesse trabalho, avaliamos, em um primeiro momento, o limite de detecção de microquimerismo, através de microssatélites (STRs), em amostras biológicas misturadas em proporções conhecidas e, posteriormente, verificamos a presença e o tempo de duração de microquimerismo em pacientes submetidos à transfusão sanguínea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais biológicos

Durante o estudo, foram analisados 3 grupos distintos de materiais biológicos. Esses grupos estão definidos abaixo:

Grupo 1: Misturas de amostras de DNA foram preparadas a partir de material biológico a ser descartado. Foram utilizadas 14 amostras no total, sendo 7 provenientes de indivíduos do sexo masculino e 7 provenientes de indivíduos do sexo feminino, assegurando que os indivíduos não eram aparentados entre si. Essas amostras de DNA foram quantificadas e misturadas (1 amostra de um indivíduo do sexo masculino com 1 amostra de um indivíduo do sexo feminino) conforme as seguintes proporções: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30. E quatro amostras foram também misturadas nas proporções de 1:50 e 1:100.

Grupo 2: Misturas de amostras de sangue foram também obtidas a partir de material biológico a ser descartado. Foram utilizadas 10 amostras no total, sendo 5 provenientes de indivíduos do sexo masculino e 5 proveniente de indivíduos do sexo feminino, assegurando que os indivíduos não eram aparentados entre si. Essas amostras de sangue foram misturadas nas seguintes proporções: 1:1, 1:10, 1:15 e 1:20. Após a mistura, os sangues foram submetidos à extração de DNA e, posteriormente, quantificadas.

Grupo 3: Vinte pacientes, com idades que variaram de 19 a 81 anos (média de 60 anos), transfundidos e internados no HCPA foram selecionados. O critério de inclusão foi paciente submetido a transfusão com uma unidade de sangue, no caso concentrado de hemácias irradiadas ou não-irradiadas, de volume entre 248 e 392ml. Foram excluídos do estudo pacientes que receberam concentrados de hemácias desleucocitados ou filtrados e indivíduos menores de 18 anos. Dos pacientes incluídos no estudo, foi coletada uma

amostra sempre antes da transfusão e, pelo menos, uma amostra após a transfusão dentro das primeiras 24 hs. Além disso, seis amostras, de indivíduos diferentes, foram coletadas uma segunda amostras entre 24 e 48hs após a transfusão. Por fim, também foi testada 1 amostra em períodos distintos, tendo como limite o período de 7 dias (ou 168 hs) após a transfusão sanguínea. Todos os sangues das bolsas foram analisados e o padrão alélico foi determinado separadamente.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue total de todas amostras, pelo método de precipitação de sais e por purificação em solução alcoólica utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA purification* Kit (Promega). A concentração de DNA de cada amostra foi realizada pela leitura de absorbância em 260nm e todas as amostras analisadas foram diluídas até uma concentração de DNA de 2ng/μl.

PCR

Um microlitro de DNA de cada amostra, antes e após a realização das misturas (de DNA ou de sangue) ou da transfusão, foram submetidas a um PCR multiplex, utilizando o kit *AmpFISTR Cofiler Plus™* (Applied Biosystems®), o qual possibilita, pelo emprego de primers fluorescentes, a análise dos seguintes marcadores (STRs): D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820 e Amelogenina, seguindo as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 11 min., seguidos por 28 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 60°C por 45 min. A reação de PCR foi realizada em um termociclador MJ Research – PTC-100.

Análise dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese capilar no analisador genético *ABI Prism 3100* (*Applied Biosystems*[®]) utilizando o Gene Scan-500 ROX como marcador interno. Os dados foram coletados pelo programa *DataCollection*[®] v.1.1 e analisados através do programa *GeneScan*[®] v.3.7 (*Applied Biosystems*[®]). Os alelos foram identificados através do programa *Genotyper Software*[®] (*Applied Biosystems*[®]), que determinou o tamanho dos alelos, comparando os resultados das amostras ao do marcador *AmpFISTR COfiler Allelic Ladder*.

RESULTADOS

Um total de 148 análises foi realizado, sendo obtido o genótipo de todas as amostras individuais, dos dois grupos de misturas, dos pacientes antes e depois das transfusões assim como a genotipagem da bolsa de sangue utilizada na transfusão. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os resultados obtidos nessas análises, com a identificação dos alelos em cada STR analisado, estão nas tabelas 1, 2 e 3.

Foi observada presença de microquimerismo nas misturas de amostras de DNA até a proporção de 1:30 (Fig 1). Nessas amostras, foi observada a presença de pelo menos dois picos, que correspondem a indivíduos distintos na mesma análise.

Nas amostras de DNA isoladas a partir de misturas de sangue foi observada a presença de microquimerismo nas proporções 1:1, 1:5 e 1:10 (Fig 2). Nesses casos, também foram observados os alelos provenientes de diferentes indivíduos.

Com a análise das amostras de DNA obtidas dos pacientes transfundidos não ficou evidenciada a presença de microquimerismo em nenhum dos pacientes nem em tempos distintos das análises após a transfusão sanguínea, nem mesmo nas primeiras 24 horas após esse procedimento (Fig 3).

DISCUSSÃO

O número de relatos com a observação de microquimerismo têm aumentando em várias áreas da medicina nos últimos anos, mas ainda são poucos os estudos sobre este assunto, sendo, em geral, limitados a análise de cromossomo Y em mulheres¹². A transfusão de sangue é uma das fontes freqüentes de ocorrência de microquimerismo e foi demonstrado previamente em várias situações, inclusive em pacientes de trauma que fizeram múltiplas transfusões¹³. A hipótese que o pequeno número de células do doador possam interferir no diagnóstico genético do receptor após uma transfusão sangüínea ainda não foi completamente comprovada, pois após a transfusão sanguínea, o receptor tem células do doador circulantes no seu organismo devido a presença de leucócitos em produtos e derivados de sangue de doadores alogênicos, mesmo em casos em que as bolsas de sangue recebidas pelo paciente tenham sido previamente irradiadas. Além disso, ainda não existem relatos claros do limite de tempo que as células do doador permanecem na circulação do receptor, o que acarreta dúvidas em relação ao tempo de espera para realização de exames moleculares em pacientes transfundidos.

Devido a esses fatores, o nosso trabalho avaliou inicialmente o limite de detecção de microquimerismo em amostras provenientes de misturas (tanto de DNA previamente extraído como de DNA extraído após uma mistura de sangue de indivíduos distintos) nas condições e com a metodologia do laboratório, a análise de STRs por PCR multiplex e eletroforese capilar. Testes semelhantes a esses já foram usados para detecção de microquimerismo⁷. Essa metodologia é altamente sensível para a avaliação do microquimerismo e os marcadores escolhidos foram os seguintes: D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO e D7S820. Esses STRs são altamente polimórficos e apresentam alto poder de exclusão, sendo rotineiramente usados em estudos de identificação humana. Além do uso da PCR, a qual já foi exaustivamente empregada em análises de pequenas

quantidades de DNA, já ficou também demonstrado previamente que a eletroforese capilar apresenta alta sensibilidade e precisão na detecção de misturas quiméricas, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*¹⁴. No nosso trabalho, a sensibilidade de detecção nas condições testadas foi avaliada através de misturas de DNA e de misturas de sangue em proporções variadas. Os resultados obtidos demonstraram que, tanto as misturas de DNA como as misturas de sangue antes do procedimento de extração de DNA, foram detectadas até uma determinada proporção (1:30 e 1:10, respectivamente), o que representa 3,3% e 10%. Essas proporções são semelhantes aos dados publicados previamente¹⁴. Portanto, a metodologia aplicada demonstrou sensibilidade adequada para identificar alelos da chamada “população menor” de células até um percentual de aproximadamente 3,0%.

Utilizando a mesma metodologia, analisamos amostras provenientes de 20 pacientes que foram submetidos a transfusão sangüínea e não observamos a presença de microquimerismo em nenhuma das amostras coletadas até 24 hs após a transfusão. Esses resultados podem ser explicados pela grande diluição que ocorre entre o sangue do doador e do receptor no momento da transfusão. Uma análise mais detalhada dessa hipótese deveria ser realizada levando em consideração o volume de sangue de cada indivíduo. Mas, considerando um volume médio de um indivíduo adulto de 8 litros e considerando que o volume das transfusões variaram de 248 a 392 ml, poderíamos estimar um percentual entre 3,1% e 4,9% de material do doador no receptor. Portanto, segundo os testes realizados na primeira etapa desse trabalho, esses valores estariam abaixo do limite mínimo de detecção da metodologia utilizada no grupo de misturas de sangue, limite esse estabelecido em 10%.

Esse estudo analisou um número limitado de indivíduos e um estudo complementar mais amplo deve ser realizado para confirmar os resultados obtidos nesse trabalho. Entretanto, considerando que as metodologias utilizadas para a realização de análises moleculares em geral não apresentam, com a tecnologia disponível atualmente, maior sensibilidade que a metodologia aplicada nesse estudo, podemos considerar que transfusões com pequeno

volume de hemoderivado não devem interferir em resultados moleculares. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo indicam que transfusões sangüíneas rotineiramente realizadas em hospitais não representam risco de interferência em análises moleculares, mesmo em amostras coletadas nas primeiras 24 horas após a realização desse procedimento clínico.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Dr^a Liane Rohsig, a enfermeira Angélica Ghinato e a secretária Marilaine Sá de Castro do Banco de sangue do HCPA, pela disponibilidade e colaboração para a realização desse trabalho. Os especiais agradecimentos aos colegas do laboratório de Identificação Genética do HCPA, André Zoratto Gastaldo e Hugo Bock, pelo apoio nos mais variados momentos. A colega do laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica, Bianca Cruz, pelo auxílio na coleta das amostras e aos demais funcionários do Serviço de Genética Médica e do Serviço de Hematologia do HCPA.

Esse trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e da Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

1. Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: An Investigative Frontier in Autoimmunity and Transplantation. *JAMA* 2004; 291: 1127-31.
2. Lambert L, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmunity Reviews* 2002; 2: 133-139.
3. Lambert NC, Dennis lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulation DNA? A quantitative answer. *Blood* 2003; 100: 2845-51.
4. Arlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clinica Chimica Acta* 2005; 360: 1-8.
5. McDaniel HB, Yang M, Sidner RA, et al. Prospective study of microchimerism in transplant recipients. *Clin. Transplantation* 1999; 13: 187-192.
6. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and the other disorders. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3: 454-63.
7. Sahota A, Yang M, McDaniel HB, et al. Evaluation of seven PCR-Based assays for the analysis of microchimerism. *Clin Biochem* 1998; 31: 641-45.
8. Carter AS, Bunce M, Cerundolo L, Welsh KI, et al. Detection of microchimerism after allogeneic blood transfusion using nested polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): A caution tale. *Blood* 1998; 92: 683-89.
9. Adams PT, Robertson DD, David AR, et al. Detection of circulation donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 1992; 80: 551-55.
10. Flesland O, Lisa SKIp, Storlien AS, Spurkland A, et al. Microchimerism in immune competent patients related to the leucocytes content of transfused red blood cell concentrates. *Transf Apher Sci* 2004; 31: 173-80.

11. Gong MNg, Sai Y, Zhou W, et al. Genotyping patients with recent blood transfusions. *Epidemiology* 2003; 14: 744-47.
12. Reed WF, LeeT-H, Trachtenberg E, Vinson M, et al. Detection of microchimerism by PCR is a function of amplification strategy. *Transfusion* 2001; 40: 39-44.
13. Lambert NC, Dennis lo YM, Erickson TD, Tylee TS, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulation DNA? A quantitative answer. *Blood* 2003; 100: 2845-51.
14. Spyridonidis A, Zeiser R, Wäsch R, et al. Capillary electrophoresis for chimerism monitoring by PCR amplification of microsatellite markers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19: 350-56.
15. Mukherjee KK, Biswas R. Short tandem repeat (STRs) and sex specific amelogenin analysis of blood samples from neurosurgical female transfused patients. *J Clin Forensic Med* 2005; 12: 10-13.

Tabela 1 – Padrão alélico das amostras de DNA.

Amostras	MARCADOR						
	D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
A	14/15	8/9	6/7	11/11	11/12	9/12	XY
B	16/17	10/13	8/9	8/8	10/10	8/9	XX
C	16/16	10/12	8/9.3	8/10	10/10	10/11	XX
D	14/17	9/9	9/9	8/11	10/12	9/9	XY
E	15/15	12/13	6/9.3	8/11	13/13	9/10	XY
F	16/18	9/12	9/9.3	10/11	12/12	11/12	XX
G	15/17	11/11	7/9.3	8/9	12/12	8/12	XX
H	16/17	12/12	6/6	8/11	11/11	10/11	XY
I	16/18	11/11	7/7	11/11	10/11	11/12	XX
J	15/16	9/9	9/9.3	8/9	10/11	8/11	XY
K	15/17	12/13	8/9.3	8/10	10/12	9/10	XY
L	16/18	11/14	6/6/	8/8	10/11	10/11	XX
M	16/17	11/12	9.3/9.3	11/11	10/11	10/10	XY
N	16/16	11/12	8/9.3	8/12	10/11	10/13	XX

Tabela 2 – Padrão alélico das amostras de sangue.

Amostras	MARCADOR						
	D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
1	15/18	11/11	6/9.3	8/11	10/11	11/11	XY
2	14/16	9/12	8/9	7/8	10/11	8/11	XX
3	15/17	11/12	9/9.3	8/12	10/12	8/9	XX
4	16/18	9/11	8/9.3	8/8	11/11	8/10	XY
5	15/17	11/11	7/9.3	8/9	12/12	8/12	XX
6	16/17	12/12	6/6	8/11	11/11	10/11	XY
7	16/18	11/11	7/7	11/11	10/11	11/12	XY
8	15/16	9/9	9/9.3	8/9	10/11	8/11	XX
9	15/17	12/13	8/9.3	8/10	10/12	9/10	XY
10	16/18	11/14	6/6	8/8	10/11	10/11	XX

Tabela 3 – Padrão alélico das amostras de cada transfusão.

Amostras		MARCADOR						
		D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
Transfusão 1	Paciente	15/18	10/12	9.3/9.3	11/11	10/10	9/11	XY
	Bolsa	16/16	13/13	6/9.3	8/8	11/13	11/12	XY
Transfusão 2	Paciente	16/16	13/13	7/9.3	8/8	10/13	10/11	XX
	Bolsa	16/16	11/13	7/9.3	8/8	11/11	8/11	XY
Transfusão 3	Paciente	17/17	8/12	9/9.3	8/11	9/11	8/12	XX
	Bolsa	17/18	9/14	9/9.3	8/11	10/12	8/11	XY
Transfusão 4	Paciente	17/17	12/13	9/9.3	8/12	10/11	11/12	XY
	Bolsa	16/16	11/11	9.3/9.3	8/8	10/12	10/10	XX
Transfusão 5	Paciente	14/15	12/12	7/8	8/11	10/12	11/12	XY
	Bolsa	15/17	12/13	9/9.3	8/8	10/12	10/11	XY
Transfusão 6	Paciente	15/16	12/12	6/7	8/8	10/12	8/9	XY
	Bolsa	15/17	9/10	7/7	6/9	10/10	10/12	XY
Transfusão 7	Paciente	14/15	12/13	8/9	8/11	10/10	8/10	XX
	Bolsa	14/16	10/13	6/7	11/11	10/10	11/12	XY
Transfusão 8	Paciente	15/18	10/12	6/9.3	9/12	11/12	9/11	XX
	Bolsa	17/17	11/12	6/9.3	8/10	10/11	10/11	XY
Transfusão 9	Paciente	16/17	8/11	7/7	8/11	12/13	10/10	XY
	Bolsa	14/15	11/13	6/8	9/11	10/12	11/12	XY
Transfusão 10	Paciente	15/18	12/12	7/9	8/8	10/10	11/11	XX
	Bolsa	15/16	11/12	6/9.3	8/8	11/11	11/11	XY
Transfusão 11	Paciente	15/15.2	9/13	7/9.3	10/10	10/11	8/10	XX
	Bolsa	15/16	11/13	9.3/9.3	9/12	11/12	8/11	XY
Transfusão 12	Paciente	14/18	9/14	7/7	8/10	11/13	8/12	XY
	Bolsa	15/18	9/11	7/9	8/11	11/13	10/10	XY
Transfusão 13	Paciente	14/14	13/13	6/8	8/9	11/12	9/11	XY
	Bolsa	15/16	11/11	6/9.3	8/12	12/12	10/10	XY
Transfusão 14	Paciente	14/15	9/11	7/9.3	8/8	12/12	10/12	XX
	Bolsa	17/17	11/13	7/9.3	8/8	10/12	9/10	XY
Transfusão 15	Paciente	15/16	10/10	7/9.3	8/9	10/12	10/11	XX
	Bolsa	15/17	11/11	9.3	9.3	8/9	10/12	XX
Transfusão 16	Paciente	15/16	9/9	9/9.3	8/11	10/12	9/10	XY
	Bolsa	15/15	11/15	6/9	8/8	10/13	11/11	XX
Transfusão 17	Paciente	15/17	11/11	6/6	9/11	10/11	10/10	XY
	Bolsa	15/17	10/13	6/9.3	11/11	11/12	11/12	XY
Transfusão 18	Paciente	15/15	11/12	9.3/9.3	8/8/	10/11	10/12	XX
	Bolsa	14/17	13/13	7/9	8/11	11/12	10/10	XY
Transfusão 19	Paciente	15/17	12/13	6/9.3	8/11	10/12	9/12	XX
	Bolsa	15/16	9/12	7/7	7/11	8/11	9/10	XY
Transfusão 20	Paciente	16/17	10/11	7/8	7/11	8/11	10/11	XX
	Bolsa	17/17	11/11	9.3/9.3	8/8	11/12	10/12	XY

FIGURA 1

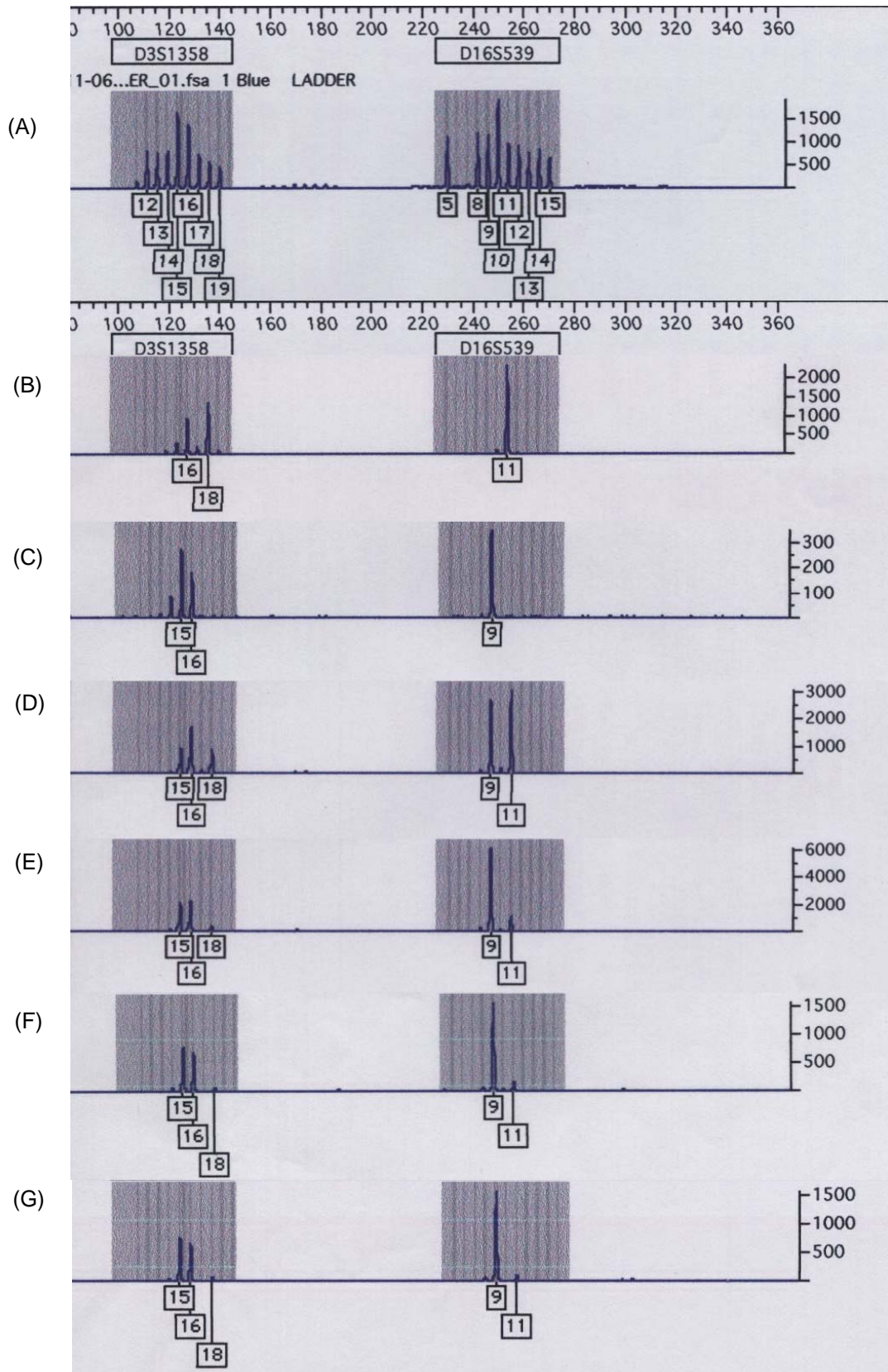


FIGURA 2

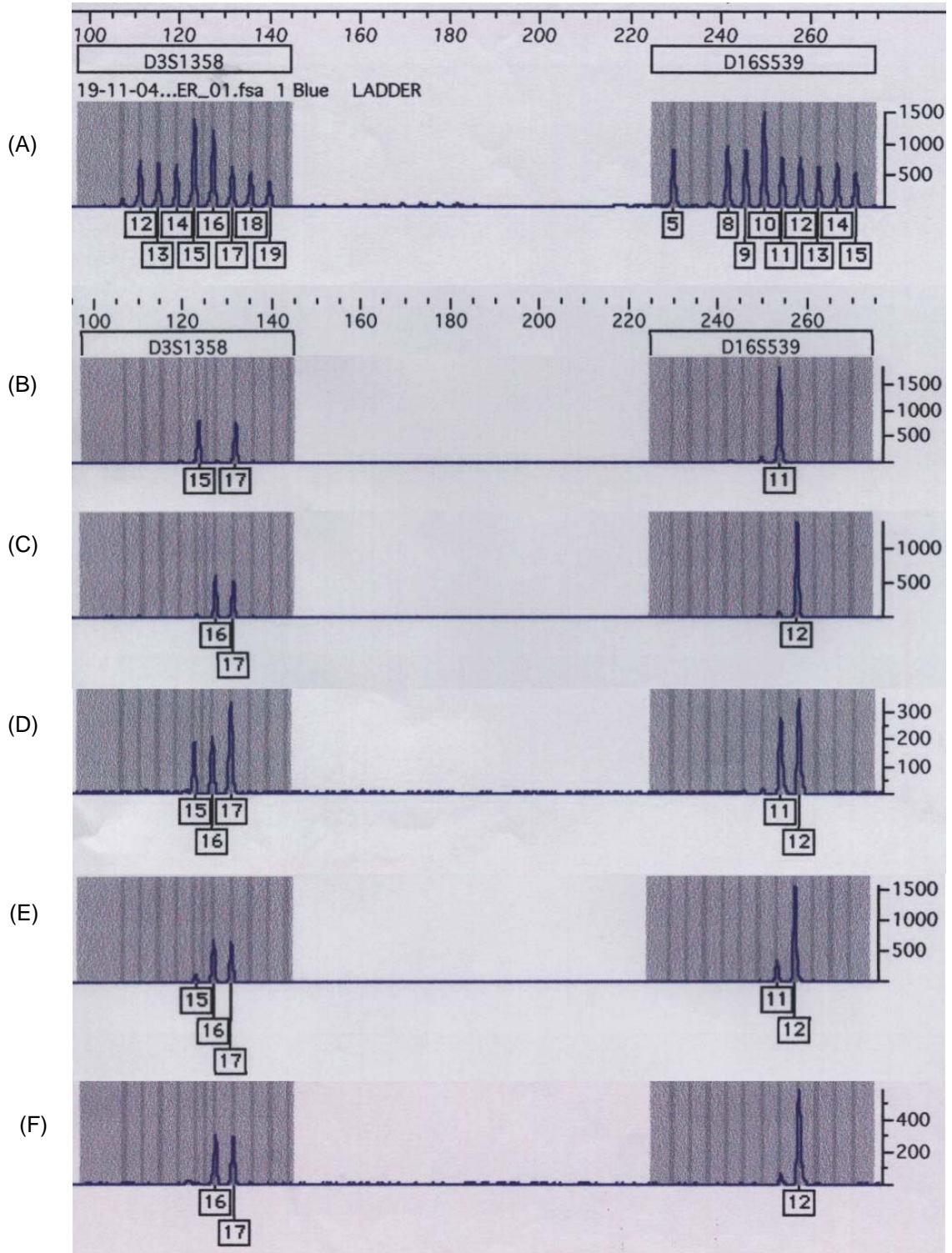
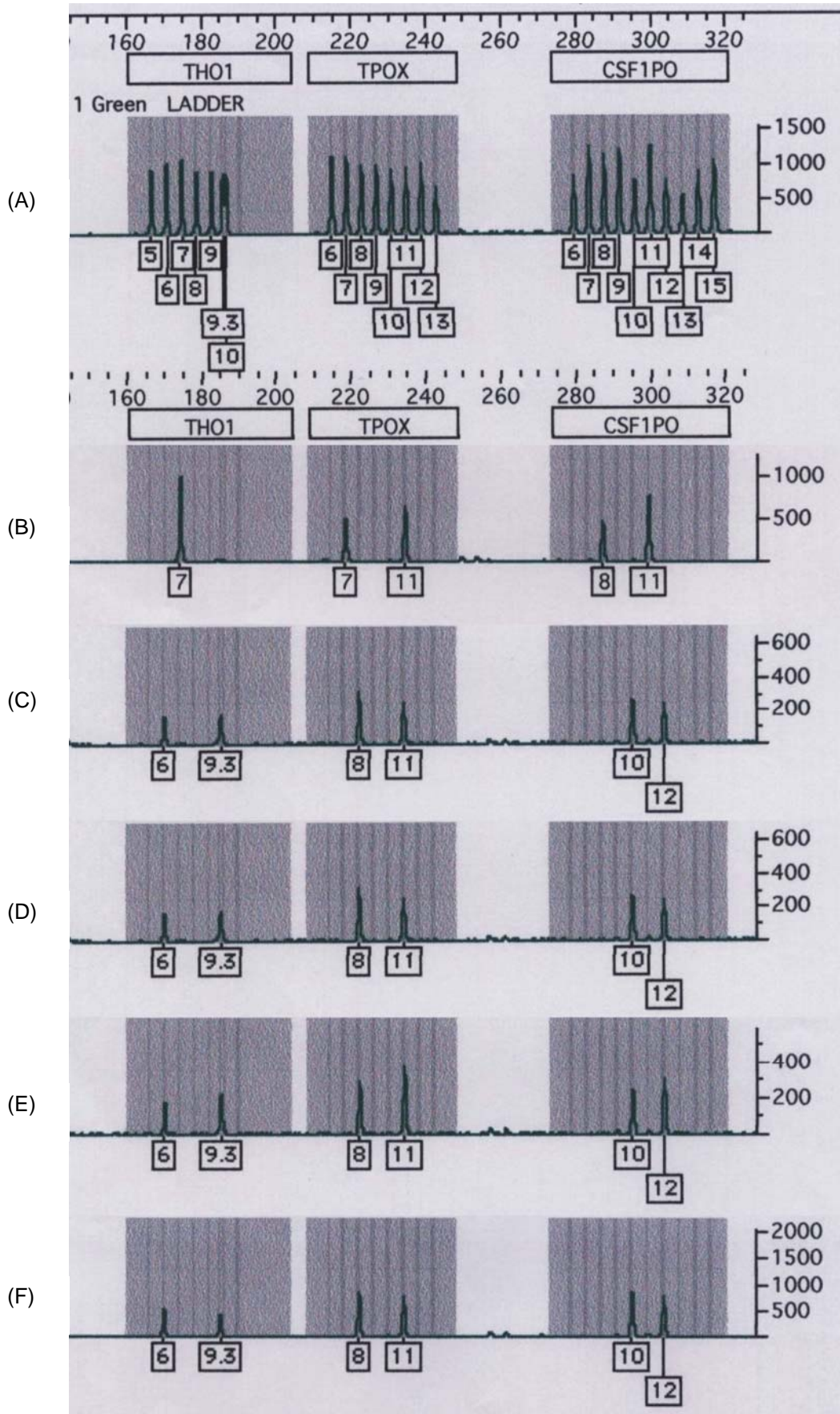


FIGURA 3



Legendas das figuras

Figura 1 – Análise dos marcadores D3S1358 e D16S539 em misturas de DNA. (A) escada alélica; (B) alelos da amostra I; (C) alelos da amostra J; (D) alelos da mistura I+J na proporção 1:1; (E) alelos da mistura I+J na proporção 1:10; (F) alelos da mistura I+J na proporção 1:20; (G) alelos da mistura I+J na proporção 1:30.

Figura 2 – Análise dos marcadores D3S1358 e D16S539 nas misturas de sangue. (A) escada alélica; (B) alelos da amostra 5; (C) alelos da amostra 6; (D) alelos da mistura 5+6 na proporção 1:1; (E) alelos da mistura 5+6 na proporção 1:10; (F) alelos da mistura 5+6 na proporção 1:15.

Figura 3 – Análise dos marcadores TH01, TPOX e CSF1PO na transfusão sangüínea 19. (A) escada alélica; (B) alelos da unidade de concentrado de hemácias usada para a transfusão; (C) alelos do receptor da transfusão; (D) alelos do receptor da transfusão coletada nas primeiras 24 hs após a transfusão; (E) alelos do receptor da transfusão coletada entre 48 e 72 hs após a transfusão; (F) alelos do receptor da transfusão coletada entre 144 e 168 hs após a transfusão.

8. ARTIGO EM INGLÊS

EVALUATION OF MICROCHIMERISM BY MICROSATELLITE ANALYSIS IN PATIENTS SUBMITTED TO BLOOD TRANSFUSION

Running head: microchimerism in patients post-transfusion

Ana Carolina Mardini¹, Rodrigo Rodenbusch¹, Maria Helena Albarus¹, Simone Schumacher¹, Ursula Matte², Roberto Giugliani^{1,2,3}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,4}.

¹Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisas – HCPA; ²Serviço de Genética Médica – HCPA; ³Depart. de Genética e ⁴Depart. de Bioquímica – UFRGS – Porto Alegre, RS.

Corresponding author:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD
Laboratório de Identificação Genética - Centro de Pesquisas
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil
Tel: + 55 51 21018011
Tel: + 55 51 21018010
E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Manuscript according to instructions of Transfusion

ABSTRACT

Background: Microchimerism has been identified in a series of biological situations, being due to clinical procedures or from physiological conditions. Blood transfusion is a procedure that can produce a mixture of donor and receptor cells. This work aimed to evaluate, at first, detection limit of microchimerism, using microsatellites (short tandem repeats - STR), in mixed biological samples OF controlled proportions and, later, to verify presence and duration of microchimerism in patients post-blood transfusion in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Study design and methods:** Analysis was performed in biological samples from three groups: DNA mixtures isolated previously to this study, blood mixtures and patients submitted to blood transfusion. All these samples were also analyzed individually. Allelic patterns were performed through PCR, using fluorescent primers, followed by capillary electrophoresis, with amplification of the following genome regions: D3S1358, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO, D7S820 and Amelogenin. **Results:** In the group of DNA mixtures, microchimerism was observed up to 1:30 (or 3,3%). In the group of blood mixtures, microchimerism was identified up to 1:10 (or 10%). However, presence of microchimerism was not identified in samples collected up to 24 h from patients submitted to blood transfusion. **Conclusion:** These results suggest that the applied methodology is sensitive to identify microchimerism in biological mixtures up to the limit of 3,3%. Therefore, we can conclude that microchimerism in patients submitted to blood transfusion evaluated in this study did not reach the minimal detection limit for the methodology applied in this work.

Key words: microchimerism, blood transfusion, STR

INTRODUCTION

Microchimerism may occur in several biological situations, both in physiological conditions as well as a result of clinical practice. In many situations, in a given biological sample, nucleated cells from a genetically distinct individual can be found (microchimerism)¹⁻⁵. This situation can occur in cases such as bone marrow transplantation, organ transplantation, pregnancy, and in blood transfusions; situations where donor cells can co-exist in the recipient's blood for a period of time⁶. In organ transplantation, microchimerism has been associated with the tolerance induction and/or maintenance of the transplanted organ⁵; the exchange of migratory leukocytes between organ and recipient can create tolerance to graft⁷. The presence of chimerism after bone marrow transplantation is essential for transplant success⁸. In pregnancy, chimeric cells occur as a result of the bidirectional traffic between the mother's cells and those of the foetus⁴. Moreover, the occurrence of fetal and maternal microchimerism is associated to autoimmune diseases¹.

In blood transfusions, where red blood cells are the major component, microchimeric interference is due to donor leukocytes. Even blood cell components previously processed may contain a small portion of leukocytes. In some cases, the routine administration of blood-derived products may be the main cause of diseases⁹ because these hemocomponents from allogeneic donors contain leukocytes capable of surviving and expanding¹⁰. Leukocytes present in bags of red blood cell concentrates used in blood transfusions may cause graft-versus-host disease (GVHD), as well as fever and, viral transmission, and may interfere in the genetic identification of the recipient. Previous studies have estimated the presence of around 10^9 leukocytes per unit of red blood cells or platelet concentrate¹¹.

DNA analysis is routinely performed in many laboratories worldwide, and is used not only for human identification and forensic medicine but also for molecular evaluation aiming at the

identification of genetic predispositions and diagnosis of inherited diseases. One of the potential problems in the routine of these laboratories is the analysis of patients who have been recently transfused, especially with total blood, red blood cell concentrate, or another derivate that contains a small ratio of leukocytes.

Some studies published in the literature evaluated different methodologies for monitoring microchimerism in specific situations. These studies showed different results, depending on type of sample/patients evaluated and level of sensibility of the technique applied in each situation.

In the present study, at first we evaluated the microchimerism detection limit through microsatellite analysis in mixed biological samples in known proportions, and later microchimerism presence and duration time was assessed in patients submitted to blood transfusion in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

MATERIAL AND METHODS

Biological Materials

During this work, three different groups of biological samples were evaluated. These groups are defined below:

Group 1: DNA samples mixtures were prepared from biological material to be discarded. Fourteen samples were used in total, being 7 from males and 7 from females; these individuals were all unrelated. These DNA samples were quantified and mixed (1 sample from a male with 1 sample from a female) according the following ratios: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, and 1:30. Moreover, 4 samples were also mixed in ratios of 1:50 and 1:100.

Group 2: Blood samples mixtures were also obtained from biological material to be discarded. Ten samples were used in total, being 5 from males and 5 from females; these individuals were also all unrelated. These blood samples were mixed in the following ratios: 1:1, 1:10, 1:15, and 1:20. After being mixed, blood was submitted to DNA extraction and DNA concentration was quantified in each mixture.

Group 3: Twenty patients, aged between 19 and 81 (mean 60 years), transfused and hospitalized at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were selected. The inclusion criterion was patient submitted to blood transfusion with one blood unit that is a concentrate of irradiated or nonirradiated red blood cells, in a volume varying from 248 to 392ml. Exclusion criteria were patients that received leucoreduction red blood cells concentrates or filtrates and individuals younger than 18 years of age. One sample before and at least one sample within 24-h after the transfusion were collected from patients. In addition, a second sample from six different individuals was collected within 24 and 48h after the transfusion. Finally,

one sample taken at different times was also collected, within 7 days (or 168h) after the blood transfusion. All blood bags were analyzed and allelic pattern was defined separately.

DNA Extraction

DNA was isolated from total blood of all samples through salt precipitation method and purification in alcohol solution using the *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega). DNA concentration from each sample was determined by optical density (OD) reading in 260nm, and all samples analyzed were diluted to a DNA concentration of 2ng/μl.

PCR

Before and after samples (DNA or blood) mixing or transfusion, 1μl of DNA from each sample was submitted to a PCR multiplex, using the *AmpFISTR Cofiler Plus™* kit (Applied Biosystems®), which enables for the analysis of the following markers (STRs): D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820, and Amelogenin, using fluorescent primers; according to manufacturer's instructions. Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 11min, followed by 28 cycles at 94°C for 1min, 59°C for 1min, and 72°C for 1min, followed by a final extension at 60°C for 45min. PCR reaction was performed in a thermocycler MJ Research – PTC-100.

PCR products analysis

PCR products were analyzed by capillary electrophoresis in the genetic analyzer *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems®) using Gene Scan-500 ROX as an internal marker. Data were collected by using DataCollection® v.1.1 program and analyzed using GeneScan® v.3.7 program (Applied Biosystems®). Alleles were identified through Genotyper Software®

(Applied Biosystems®) that determined size of alleles, using the *AmpFISTR COfiler Allelic Ladder* as a standard reference.

RESULTS

A total of 148 analyses were performed, and the allelic pattern from both mixtures groups as well as patients before and after transfusion and from blood bags were all identified. All analyses were made in duplicates. Results of these analyses with the identification of alleles in each STR are showed in tables 1, 2, and 3.

Microchimerism was observed in the DNA mixtures up to a ratio of 1:30 (Fig 1). In these samples, at least two peaks were seen that can correspond to biological material from different individuals in the same analysis. These differences were proved by comparing results obtained from allelic pattern in the individual allelic pattern.

In the DNA samples isolated from blood mixtures, microchimerism was found in the ratios 1:1, 1:5, and 1:10 (Fig 2). In these cases, alleles from different individuals, based on their individual allelic pattern, were also found.

Analysis of DNA samples obtained from transfused patients did not show microchimerism in any of the patients at any time tested following blood transfusion, not even in samples collected within 24-hours after the blood transfusion (Fig 3).

DISCUSSION

The number of reports of presence of microchimerism has been increasing in various medical areas in the past years; however, studies on this matter are still limited and are usually restricted to the analysis of chromosome Y in women¹². Blood transfusion is a frequent source of microchimerism, and this has been showed in several situations, including multi-transfused trauma patients¹³. The hypothesis that a small number of donor cells may interfere in the genetic diagnosis of the recipient following blood transfusion has not been fully confirmed, since after a blood transfusion recipients have donor cells circulating in their body due to the presence of leukocytes in blood products and derivatives of allogeneic donors, even in cases where blood bags have been previously irradiated. In addition, there are no clear time limits as to how long donor cells remain in the recipient's circulation, which raises questions as to how long should one wait to perform molecular assays in transfused patients.

Due to these issues, the present study initially assessed the microchimerism detection limit in mixed samples (both from previously extracted DNA and DNA extracted after a mixture of blood from different individuals) under the conditions and according to our laboratory methodology. Assays that use microsatellites (STRs) analysis have been previously used to detect microchimerism⁷. This methodology is highly sensitive to microchimerism evaluation and selected STR were the following: D3S1358, D16S539, TH01, TPOX, CSF1PO, and D7S820. These STR are highly polymorphic and show high exclusion power, being routinely used in human identification studies. Besides the use of PCR, which have been exhaustively employed to analyze small amounts of DNA, it was also already demonstrated that capillary electrophoresis shows high sensibility and precision in the detection of chimeric mixtures, in both *in vivo* and *in vitro* studies¹⁴. In the present study, detection sensibility under the conditions tested was evaluated by means of DNA mixtures and blood mixtures in different ratios. The results obtained herein showed that both DNA mixtures and blood mixtures

before the DNA extraction were detected up to a certain ratio (1:30 and 1:10, respectively) that represents 3.3% and 10%. These ratios are similar to data published in the literature¹⁴. Therefore, the methodology applied showed adequate sensibility to identify alleles of the so-called “smaller population” of cells up to a percentage of approximately 3%.

Using the same methodology, samples of 20 patients submitted to blood transfusions were analyzed, and microchimerism was not seen in any of them within 24h after the transfusion. This result may be due to the great dilution that happens between donor and recipient blood. We are aware that a more detailed study should be performed to test this hypothesis taking into consideration blood volume of each individual. However, considering a mean volume of 8 liters for an adult and the fact that the volume of transfusions ranged between 248 and 392 ml, a percentage between 3.1% and 4.9% of donor material in the recipient could be estimated. Therefore, according to assays previously carried out, these values would be below the detection limit established in the mixed blood group using the methodology employed herein that was determined to be 10%.

We are aware that number of samples evaluated here is limited and a wider study would be important to confirm our findings. However, considering that methodologies used to perform molecular analyses do not usually have greater sensibility than the methodology applied here, we can suggest that transfusions of small volumes of hemoderivates should not interfere in molecular results. Therefore, results generated by this study indicate that blood transfusions routinely performed in hospitals do not represent interference risk for molecular analyses, even when a blood sample is collected within the first 24 hours after this clinical procedure.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Liane Rohsig, Nurse Angélica Ghinato, and the secretary Marilaine Sá de Castro for their availability and collaboration to this study. Our special thanks to André Zoratto Gastaldo and Hugo Bock for their help at any time. We would like to also thank our colleague from Molecular Genetics Laboratory, Bianca Cruz, for her help with sample collection, and to the staff of Medical Genetics Service and Hematology Service (HCPA).

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Research Funding of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and PROPESq-UFRGS.

REFERENCES

1. Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: An Investigative Frontier in Autoimmunity and Transplantation. *JAMA* 2004; 291: 1127-31.
2. Lambert L, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmunity Reviews* 2002; 2: 133-139.
3. Lambert NC, Dennis lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulation DNA? A quantitative answer. *Blood* 2003; 100: 2845-51.
4. Arlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. *Clinica Chimica Acta* 2005; 360: 1-8.
5. McDaniel HB, Yang M, Sidner RA, et al. Prospective study of microchimerism in transplant recipients. *Clin. Transplantation* 1999; 13: 187-192.
6. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and the other disorders. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3: 454-63.
7. Sahota A, Yang M, McDaniel HB, et al. Evaluation of seven PCR-Based assays for the analysis of microchimerism. *Clin Biochem* 1998; 31: 641-45.
8. Carter AS, Bunce M, Cerundolo L, Welsh KI, et al. Detection of microchimerism after allogeneic blood transfusion using nested polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): A caution tale. *Blood* 1998; 92: 683-89.
9. Adams PT, Robertson DD, David AR, et al. Detection of circulation donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 1992; 80: 551-55.
10. Flesland O, Lisa SKI, Storlien AS, Spurkland A, et al. Microchimerism in immune competent patients related to the leucocytes content of transfused red blood cell concentrates. *Transf Apher Sci* 2004; 31: 173-80.

11. Gong MNg, Sai Y, Zhou W, et al. Genotyping patients with recent blood transfusions. *Epidemiology* 2003; 14: 744-47.
12. Reed WF, LeeT-H, Trachtenberg E, Vinson M, et al. Detection of microchimerism by PCR is a function of amplification strategy. *Transfusion* 2001; 40: 39-44.
13. Lambert NC, Dennis lo YM, Erickson TD, Tylee TS, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulation DNA? A quantitative answer. *Blood* 2003; 100: 2845-51.
14. Spyridonidis A, Zeiser R, Wäsch R, et al. Capillary electrophoresis for chimerism monitoring by PCR amplification of microsatellite markers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19: 350-56.
15. Mukherjee KK, Biswas R. Short tandem repeat (STRs) and sex specific amelogenin analysis of blood samples from neurosurgical female transfused patients. *J Clin Forensic Med* 2005; 12: 10-13.

Table 1 – DNA samples allelic pattern.

Samples	MARKER						
	D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
A	14/15	8/9	6/7	11/11	11/12	9/12	XY
B	16/17	10/13	8/9	8/8	10/10	8/9	XX
C	16/16	10/12	8/9.3	8/10	10/10	10/11	XX
D	14/17	9/9	9/9	8/11	10/12	9/9	XY
E	15/15	12/13	6/9.3	8/11	13/13	9/10	XY
F	16/18	9/12	9/9.3	10/11	12/12	11/12	XX
G	15/17	11/11	7/9.3	8/9	12/12	8/12	XX
H	16/17	12/12	6/6	8/11	11/11	10/11	XY
I	16/18	11/11	7/7	11/11	10/11	11/12	XX
J	15/16	9/9	9/9.3	8/9	10/11	8/11	XY
K	15/17	12/13	8/9.3	8/10	10/12	9/10	XY
L	16/18	11/14	6/6/	8/8	10/11	10/11	XX
M	16/17	11/12	9.3/9.3	11/11	10/11	10/10	XY
N	16/16	11/12	8/9.3	8/12	10/11	10/13	XX

Table 2 – Blood samples allelic pattern.

Sample	MARKER						
	D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
1	15/18	11/11	6/9.3	8/11	10/11	11/11	XY
2	14/16	9/12	8/9	7/8	10/11	8/11	XX
3	15/17	11/12	9/9.3	8/12	10/12	8/9	XX
4	16/18	9/11	8/9.3	8/8	11/11	8/10	XY
5	15/17	11/11	7/9.3	8/9	12/12	8/12	XX
6	16/17	12/12	6/6	8/11	11/11	10/11	XY
7	16/18	11/11	7/7	11/11	10/11	11/12	XY
8	15/16	9/9	9/9.3	8/9	10/11	8/11	XX
9	15/17	12/13	8/9.3	8/10	10/12	9/10	XY
10	16/18	11/14	6/6/	8/8	10/11	10/11	XX

Table 3 – Allelic patterns from samples from each blood transfusion.

Samples		MARKER						
		D3S1358	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	D7S820	Amelo
Transfusion 1	Patient	15/18	10/12	9.3/9.3	11/11	10/10	9/11	XY
	Bag	16/16	13/13	6/9.3	8/8	11/13	11/12	XY
Transfusion 2	Patient	16/16	13/13	7/9.3	8/8	10/13	10/11	XX
	Bag	16/16	11/13	7/9.3	8/8	11/11	8/11	XY
Transfusion 3	Patient	17/17	8/12	9/9.3	8/11	9/11	8/12	XX
	Bag	17/18	9/14	9/9.3	8/11	10/12	8/11	XY
Transfusion 4	Patient	17/17	12/13	9/9.3	8/12	10/11	11/12	XY
	Bag	16/16	11/11	9.3/9.3	8/8	10/12	10/10	XX
Transfusion 5	Patient	14/15	12/12	7/8	8/11	10/12	11/12	XY
	Bag	15/17	12/13	9/9.3	8/8	10/12	10/11	XY
Transfusion 6	Patient	15/16	12/12	6/7	8/8	10/12	8/9	XY
	Bag	15/17	9/10	7/7	6/9	10/10	10/12	XY
Transfusion 7	Patient	14/15	12/13	8/9	8/11	10/10	8/10	XX
	Bag	14/16	10/13	6/7	11/11	10/10	11/12	XY
Transfusion 8	Patient	15/18	10/12	6/9.3	9/12	11/12	9/11	XX
	Bag	17/17	11/12	6/9.3	8/10	10/11	10/11	XY
Transfusion 9	Patient	16/17	8/11	7/7	8/11	12/13	10/10	XY
	Bag	14/15	11/13	6/8	9/11	10/12	11/12	XY
Transfusion 10	Patient	15/18	12/12	7/9	8/8	10/10	11/11	XX
	Bag	15/16	11/12	6/9.3	8/8	11/11	11/11	XY
Transfusion 11	Patient	15/15.2	9/13	7/9.3	10/10	10/11	8/10	XX
	Bag	15/16	11/13	9.3/9.3	9/12	11/12	8/11	XY
Transfusion 12	Patient	14/18	9/14	7/7	8/10	11/13	8/12	XY
	Bag	15/18	9/11	7/9	8/11	11/13	10/10	XY
Transfusion 13	Patient	14/14	13/13	6/8	8/9	11/12	9/11	XY
	Bag	15/16	11/11	6/9.3	8/12	12/12	10/10	XY
Transfusion 14	Patient	14/15	9/11	7/9.3	8/8	12/12	10/12	XX
	Bag	17/17	11/13	7/9.3	8/8	10/12	9/10	XY
Transfusion 15	Patient	15/16	10/10	7/9.3	8/9	10/12	10/11	XX
	Bag	15/17	11/11	9.3	9.3	8/9	10/12	XX
Transfusion 16	Patient	15/16	9/9	9/9.3	8/11	10/12	9/10	XY
	Bag	15/15	11/15	6/9	8/8	10/13	11/11	XX
Transfusion 17	Patient	15/17	11/11	6/6	9/11	10/11	10/10	XY
	Bag	15/17	10/13	6/9.3	11/11	11/12	11/12	XY
Transfusion 18	Patient	15/15	11/12	9.3/9.3	8/8/	10/11	10/12	XX
	Bag	14/17	13/13	7/9	8/11	11/12	10/10	XY
Transfusion 19	Patient	15/17	12/13	6/9.3	8/11	10/12	9/12	XX
	Bag	15/16	9/12	7/7	7/11	8/11	9/10	XY
Transfusion 20	Patient	16/17	10/11	7/8	7/11	8/11	10/11	XX
	Bag	17/17	11/11	9.3/9.3	8/8	11/12	10/12	XY

FIGURE 1

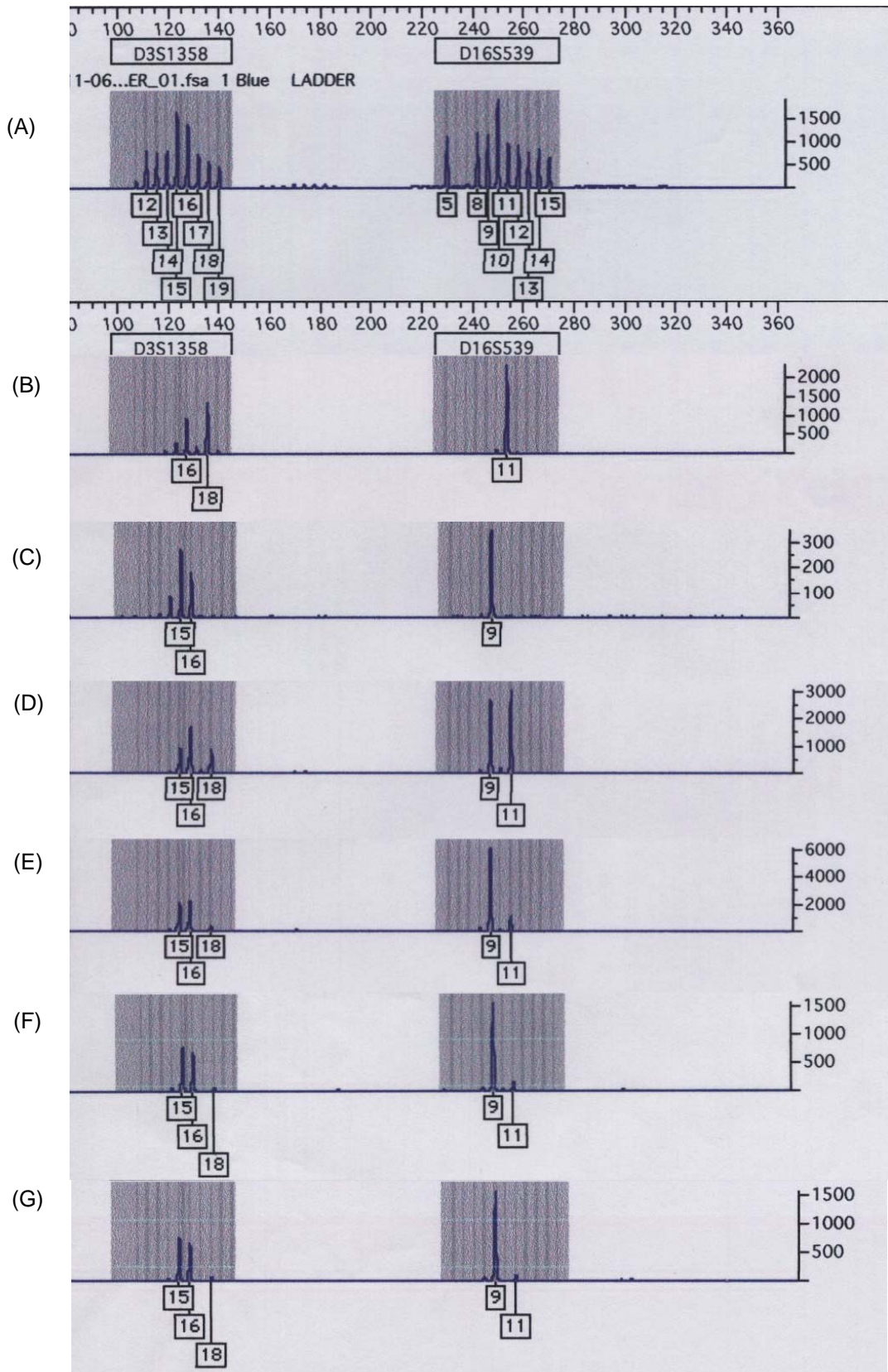


FIGURE 2

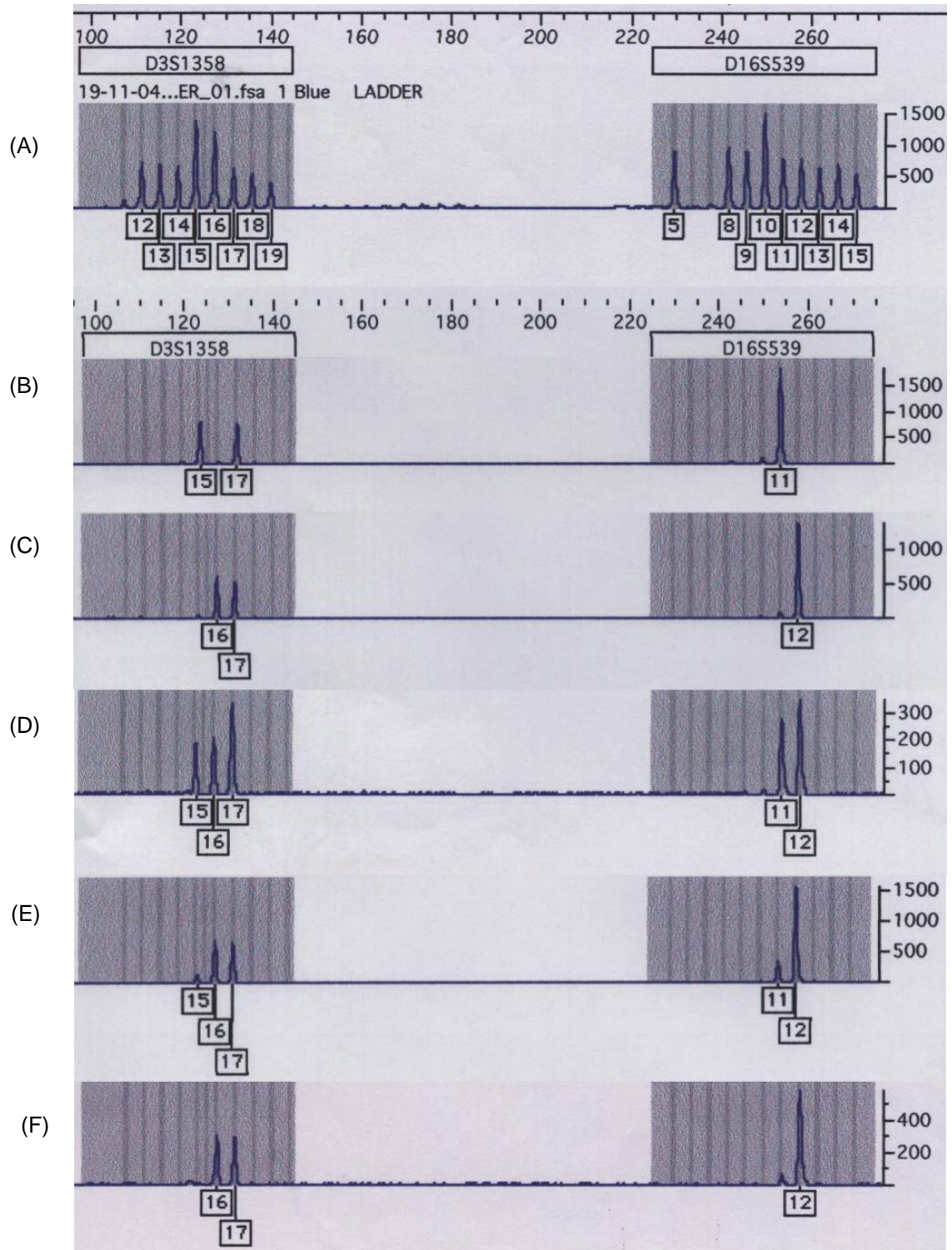


FIGURE 3

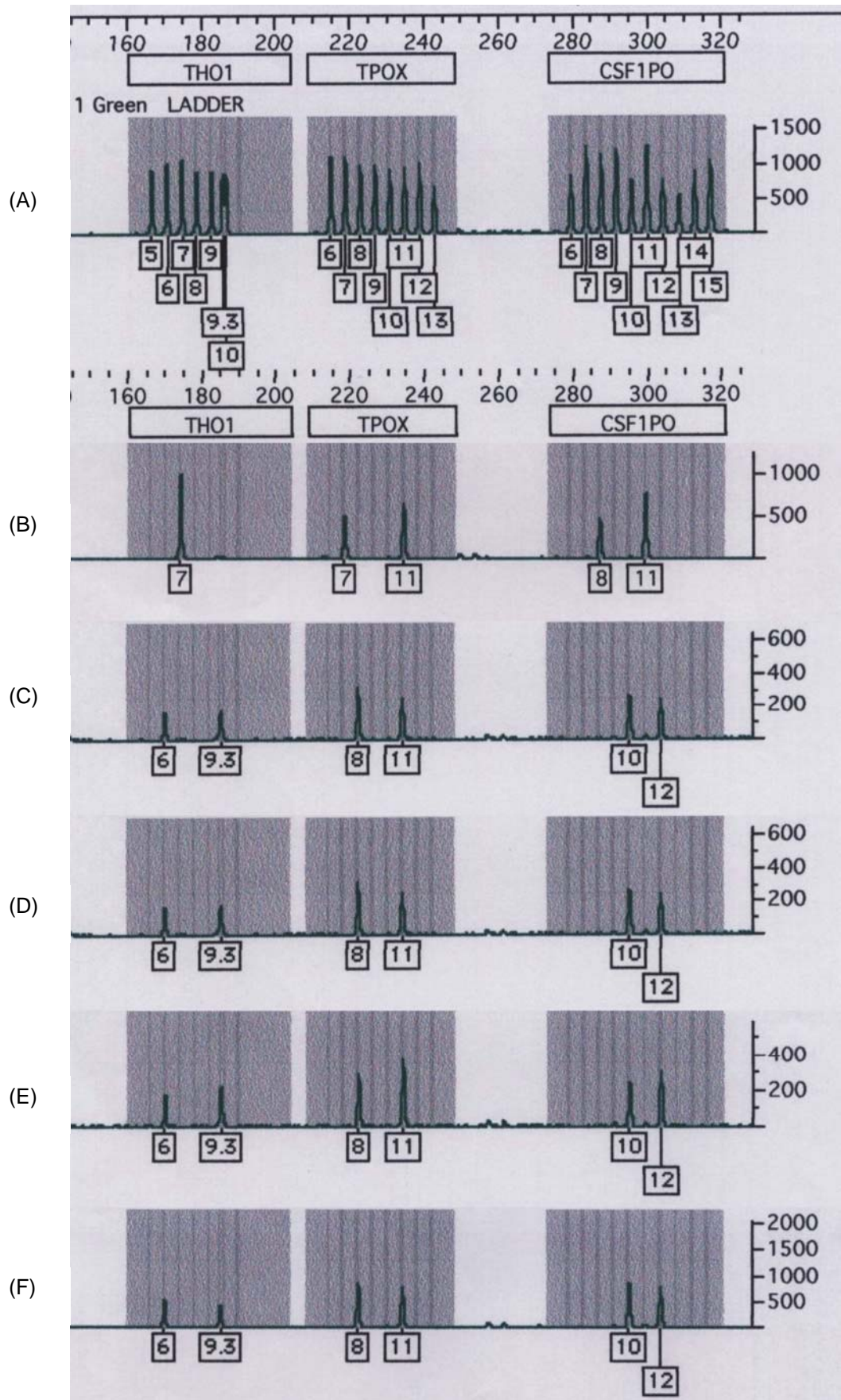


Figure legends

Figure 1 – Analysis of D3S1358 and D16S539 markers in DNA mixtures. (A) allelic ladder; (B) alleles of sample I; (C) alleles of sample J; (D) alleles of mixture I+J in the ratio 1:1; (E) alleles of mixture I+J in ration 1:10; (F) alleles of mixture I+J in ration 1:20; (G) alleles of mixture I+J in ration 1:30.

Figure 2 – Analysis of D3S1358 and D16S539 markers in blood mixtures. (A) allelic ladder; (B) alleles of sample 5; (C) alleles of sample 6; (D) alleles of mixture 5+6 in the ratio 1:1; (E) alleles of mixture 5+6 in ratio 1:10; (F) alleles of mixture 5+6 in ration 1:15.

Figure 3 – Analysis of TH01, TPOX and CSF1PO markers in transfusion 19. (A) allelic ladder; (B) alleles from the unit of red blood cells concentrate used in the transfusion; (C) alleles from transfusion receptor; (D) alleles from transfusion receptor of a sample collected within first 24 hours post-transfusion; (E) alleles from transfusion receptor of a sample collected between 48 and 72 hours post-transfusion; (F) alleles from transfusion receptor of a sample collected between 144 and 168 hours post-transfusion.

M322a Mardini, Ana Carolina

Avaliação de microquimerismo por análise de microssatélites em pacientes submetidos à transfusão sanguínea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. / Ana Carolina Mardini; orient. Maria Luiza Saraiva Pereira – 2006.
78 f. il. col.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Transfusão de sangue 2. Quimerismo 3. Satélite I. Pereira, Maria Luiza Saraiva II. Título.

NLM: WH 120

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.