

**ANA LUCIA VIEIRA-MION**

**AVALIAÇÃO, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE REGIÕES  
HIPERVARIÁVEIS DO GENOMA HUMANO, DA  
RECUPERAÇÃO AUTÓLOGA, ALOGÊNICA OU QUIMÉRICA  
EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA SEVERA,  
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.**

**Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Genética do Departamento de  
Genética da Universidade do  
Paraná, como requisito parcial  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas.**

**CURITIBA**

**2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE REGIÕES  
HIPERVARIÁVEIS DO GENOMA HUMANO, DA  
RECUPERAÇÃO AUTÓLOGA, ALOGÊNICA OU QUIMÉRICA  
EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA SEVERA,  
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Genética do Departamento de Genética da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas, área de concentração: Genética.**

**Aluna: Ana Lucia Vieira-Mion**

**Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli**

**CURITIBA**

**2000**



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
Curso de Pós-Graduação em Genética

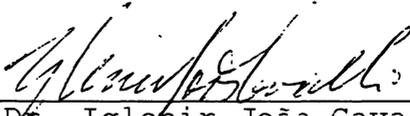
## P A R E C E R

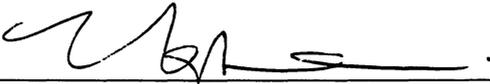
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **ANA LÚCIA VIEIRA-MION**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito " **A** ".

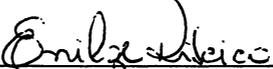
Secretaria da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 07 de agosto de 2000.

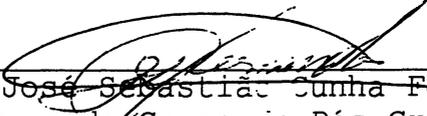
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Iglénir João Cavalli  
Orientador e Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neiva Isabel Rodrigues Magdalena  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de S. Fonseca Ribeiro  
Membro

Visto:

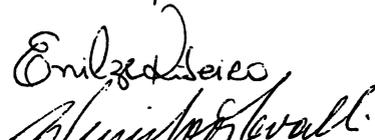
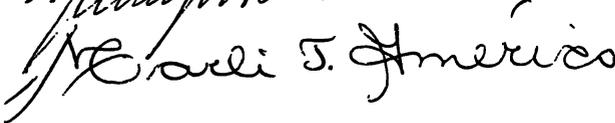
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Sebastião Cunha Fernandes  
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
em Genética



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
Curso de Pós-Graduação em Genética

Ata da defesa de dissertação de mestrado da aluna  
**ANA LUCIA VIEIRA-MION**

Aos sete dias do mês de agosto de dois mil, foi realizada no Departamento de Genética, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestrande Ana Lúcia Vieira-Mion, intitulada "Avaliação, através da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano, da recuperação autóloga, alogênica ou quimérica em pacientes com anemia aplástica severa, submetidos ao transplante de medula óssea". Os trabalhos foram iniciados às quatorze horas e dez minutos pelo Professor Doutor Iglénir João Cavalli, orientador da candidata e presidente da Banca Examinadora. O Professor Doutor Iglénir João Cavalli passou a palavra a aluna para que fizesse uma apresentação sucinta da sua dissertação. Após a explanação oral o Doutor Iglénir João Cavalli passou a palavra ao primeiro examinador, a Professora Doutora Neiva Isabel Rodrigues Magdalena do Departamento de Pediatria do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Dando prosseguimento, usou a palavra o segundo examinador, a Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Para finalizar usou a palavra o terceiro examinador, o Professor Doutor Iglénir João Cavalli, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, orientador da candidata. Todos os examinadores mantiveram diálogo com a candidata e consideraram a dissertação de excelente nível. Finda a defesa da dissertação, o senhor presidente da Banca Examinadora, orientador da candidata, fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a banca examinadora iria proceder o ato de atribuição dos conceitos, reunindo-se em sessão secreta. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após este intervalo foram proclamados os resultados atribuídos pela Banca Examinadora, a seguir descritos: Professora Doutora Neiva Isabel Rodrigues Magdalena, conceito "A", Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, conceito "A" e o Professor Doutor Iglénir João Cavalli, conceito "A". Com o conceito médio final "A", e, tendo cumprido o artigo trinta e sete do regimento do Curso, a candidata fez juz ao grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética. E, como não havia nada mais a ser tratado, o senhor presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos às quinze horas e quarenta e cinco minutos, dos quais eu, Marli Tereza Américo, secretária do curso, lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com o senhor presidente e os demais senhores examinadores. Curitiba, sete de agosto de dois mil.

  
Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro  
  
Iglénir João Cavalli  
  
Marli Tereza Américo

Aos meus pais, Gervásio e Maria,  
que me ensinaram a lutar.

Ao meu esposo, Marcelo, pelo  
amor e incentivo constantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pela sua eficiente orientação contribuindo valiosamente para a minha formação profissional.

À Noemi Farah Pereira e Enilze M. de S. Fonseca Ribeiro, pelo estímulo e apoio essenciais para o início e execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná onde a parte experimental deste trabalho foi realizada, pelo incentivo, amizade e cooperação proporcionando um ambiente necessário para atingir esta fase da minha vida profissional. Em especial agradeço a Carlos Alberto Martinez Alonso, Marcelo Malaghini, Valdez Ravaglio Jamur e Marcia Fabrício de Melo.

À toda equipe do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná que, através de seu espírito científico, tornou possível a concretização deste trabalho. Em especial ao Dr. Marco Antônio Bitencourt e Heliz Regina das Neves.

Aos pacientes e seus doadores, pela generosa doação do material biológico utilizado, o meu especial agradecimento.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante a fase inicial deste estudo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. ANEMIA APLÁSTICA SEVERA - ASPECTOS CLÍNICOS.....	1
1.2. ETIOLOGIA.....	5
1.3. FISIOPATOLOGIA.....	9
2. ANEMIA APLÁSTICA SEVERA – TRATAMENTO.....	11
2.1 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	11
2.1.1 Aspectos gerais.....	11
2.1.2 Critérios de seleção de doadores para TMO alogênico.....	15
2.1.3 Condicionamento.....	16
2.1.4 Indicações.....	18
2.1.5 Complicações pós-transplante.....	18
2.2 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS.....	22
3. REPOPLAÇÃO DO SISTEMA HEMATOPOÉTICO NO PÓS-TRANSPLANTE.....	24
4. REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO GENOMA HUMANO.....	26
5. OBJETIVOS.....	37
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	38
2. METODOLOGIA.....	42

2.1.Extração do DNA genômico.....	42
2.1.1. Extração do DNA de sangue periférico.....	42
2.1.2. Extração do DNA de bulbo capilar.....	44
2.2.Quantificação das amostras de DNA.....	45
2.3.Amplificação do DNA.....	45
2.4.Corrída eletroforética.....	51
2.4.1 Aplicação das amostras amplificadas.....	52
2.4.2 Visualização dos produtos amplificados pela PCR.....	52
2.5 Interpretação dos resultados.....	53
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>IV. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>V. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	anemia aplástica severa
AmpFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
APS	persulfato de amônio
BUS	bussulfan
CFA	ciclofosfamida
CPH	complexo principal de histocompatibilidade
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
GAL	globulina antilinfocítica
GAT	globulina antitimocítica
HLA	antígenos leucocitários humanos
HPN	hemoglobinúria paroxística noturna
IFN $\gamma$	interferon gama
LLA	leucemia linfocítica aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
MDS	mielodisplasia
PCR	reação em cadeia da polimerase
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SSR	seqüências repetitivas simples
STMO-HC/UFPR	Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
STR	<i>short tandem repeats</i>
Taq polimerase	enzima polimerase do microorganismo <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletileno diamina
TMO	transplante de medula óssea
TNF	fator de necrose tumoral
VNTR	número variável de repetições em <i>tandem</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Modelo de um loco de seqüências repetitivas .....	29
Figura 2 : Padrão de recuperação alogênico através da amplificação simultânea dos seis locos utilizando sistema multiplex .....	48
Figura 3 : Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>ACTBP2</b> .....	63
Figura 4 : Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>TPO</b> .....	64
Figura 5 : Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>ARA</b> .....	65
Figura 6: Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>TH01</b> .....	66
Figura 7 : Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>D1S80</b> .....	67
Figura 8 : Padrões eletroforéticos informativos e não informativo para o loco <b>33.6</b> .....	68
Figura 9 : Padrões eletroforéticos com diferentes graus de quimerismo.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Classificação etiológica das anemias aplásticas .....	3
Tabela 2 : Algumas causas da anemia aplástica adquirida .....	5
Tabela 3 : Sexo, idade e grupo sanguíneo do sistema ABO dos 37 pares de irmãos.....	38
Tabela 4 : Número de transfusões, tipo de condicionamento, data do TMO e tempo de coleta do material após o TMO.....	40
Tabela 5 : Características dos locos analisados .....	45
Tabela 6 : Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores .....	46
Tabela 7 : Locos informativos e não informativos .....	55
Tabela 8 : Tipo de recuperação e evolução clínica dos pacientes quanto à DECH e a rejeição e data de ocorrência das mesmas .....	57
Tabela 9 : Número de pacientes com recuperação alogênica e quimérica analisados quanto à rejeição (A), DECH (B) e que foram submetidos a diferentes tipos de condicionamento .....	60
Tabela 10 : Número de pacientes com quimerismo até 55% de células do doador e com 80 a 95% de células do doador analisados quanto à rejeição (A), DECH (B) e que foram submetidos a diferentes tipos de condicionamento (C).....	61

## RESUMO

Foram estudados trinta e sete pacientes com anemia aplásica severa, submetidos ao transplante de medula óssea, no período de 1983 a 1998, no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. A avaliação da recuperação autóloga, alogênica e quimérica através da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano pelo emprego da PCR em amostras de sangue periférico (do paciente e do doador) e de fios de cabelo (do paciente), foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Serviço de Análises Clínicas da UFPR. Foram estudados seis locos VNTR: **D1S80, ACTBP2, TH01, ARA, 33.6 e TPO**. Das 222 reações de amplificação realizadas apenas uma (0,45%) não teve sucesso. Das 221 restantes, 133 (60,18%) foram informativas e 88 (39,82%) foram não informativas. A aplicação do teste do  $\chi^2$ , com o objetivo de avaliar se os resultados informativos e não informativos distribuíram-se igualmente nos seis locos analisados, indicou um valor de  $\chi^2_5 = 10,898$ .  $P > 0,05$ , não significativo. Quatro (10,8%) pacientes apresentaram recuperação autóloga. Todos estes apresentaram rejeição e um apresentou DECH. Estes pacientes não foram incluídos nas análises estatísticas. Dezoito (48,65%) dos pacientes apresentaram recuperação alogênica e quinze (40,54%) apresentaram quimerismo. Com o objetivo de avaliar se a ocorrência de rejeição e DECH, independe do tipo de recuperação (alogênica ou quimérica) aplicamos aos dados o teste exato de Fisher que indicou valores de  $P = 1,26\%$  e  $P = 3,60\%$  (significantes), respectivamente. Verificamos também, que o tipo de recuperação independe do tipo do condicionamento (CFA 200 mg/kg de peso ou CFA 200 mg/kg de peso + BUS 12 mg/kg de peso):  $P = 46,10\%$ , não significativa. Nos pacientes que apresentaram recuperação quimérica com até 55% de células do doador e com 80 a 95% de células do doador, verificamos se a ocorrência de rejeições ou DECH, independe do grau de quimerismo. O teste exato de Fisher indicou valores de  $P = 10,02\%$  e  $P = 53,33\%$  (não significantes), respectivamente. Também, o grau de quimerismo independe do tipo de condicionamento (CFA 200 mg/kg de peso ou CFA 200 mg/kg de peso + BUS 12 mg/kg de peso), conforme o valor do teste exato de Fisher ( $P = 59,52\%$ , não significativa). A análise do coeficiente de regressão indicou que o tipo de recuperação quimérica (com até 55% de células do doador), quimérica (com 80 a 95% de células do doador) e alogênica depende do tempo de coleta do material após o TMO ( $b=0,0071 \pm 0,0033$ ;  $t = 2,151$ ;  $P < 0,05$ ).

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1. ANEMIA APLÁSTICA SEVERA - ASPECTOS CLÍNICOS**

As anemias aplásticas constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoéticas caracterizadas por medula óssea hipocelular em graus variados, em combinação com pancitopenia no sangue periférico (WINTROBE, 1993; STORB, 1994). Esta desordem normalmente está associada com uma variedade de agentes etiológicos e, muito provavelmente, com vários e diferentes mecanismos patogênicos.

O início da doença é normalmente insidioso, sendo que os primeiros sintomas incluem desde fadiga e fraqueza decorrentes da anemia até hemorragias de gengiva, pele, nariz e trato gastrointestinal devido à trombocitopenia. O exame clínico além de revelar palidez, freqüentemente, constata a presença de petéquias e equimoses na epiderme, mucosas e conjuntiva (WINTROBE, 1993; STORB, 1994).

Conforme WINTROBE (1993) e YOUNG (1994) o primeiro relato de estudos a respeito de anemia é tradicionalmente datado de 1888 quando Paul Erlich descreveu o caso de uma mulher jovem com anemia grave e que veio a falecer em decorrência da doença. O quadro descrito por Paul Erlich era de rápida evolução e estava associado a febre e hemorragias. A gravidade da doença para a paciente e o fato da medula óssea ter se apresentado

hipocelular na autópsia, motivou os hematologistas para empreenderem estudos mais aprofundados. A patogenia descrita era semelhante ao que hoje se denomina anemia aplástica, termo introduzido em 1904 por Chauffard para descrever situações onde a pancitopenia de qualquer etiologia estivesse presente (YOUNG, 1994). Até 1934, entretanto, a anemia aplástica não era claramente definida e este termo tinha emprego generalizado. Em 1959, Wintrobe sugeriu que o termo anemia aplástica deveria ser usado em casos com pancitopenia e grave hipoplasia da medula óssea, na ausência de qualquer doença primária que pudesse suprimir o tecido hematopoético (citado por WINTROBE, 1993).

Posteriormente, passou-se a utilizar o termo anemia aplástica apenas para um quadro clínico onde a medula óssea estivesse preenchida por tecido adiposo. Quando uma medula óssea normocelular ou hipocelular estivesse associada com pancitopenia, o termo mais apropriado para se utilizar seria anemia refratária (JANDL, 1987).

A introdução do exame de aspirados da medula óssea, usualmente da crista ilíaca, foi de fundamental importância para esclarecer que pancitopenia não é sinônimo de anemia aplástica. A pancitopenia pode estar presente no sangue periférico com função relativamente normal da medula óssea (YOUNG, 1994).

A classificação das anemias aplásticas é importante para determinar o prognóstico, a terapêutica e como auxílio ao entendimento da patogênese.

Segundo PASQUINI (1991) e WINTROBE (1993), as mesmas podem ser classificadas etiologicamente em adquiridas e constitucionais, sendo que as adquiridas são agrupadas em função dos agentes causais. Esta classificação etiológica é apresentada na tabela 1.

A forma mais comum de anemia aplástica constitucional a anemia de Fanconi, doença com padrão de herança autossômica recessiva, que geralmente manifesta-se na infância. Anomalias congênitas incluindo baixa estatura, hiperpigmentação da pele e anormalidades ósseas normalmente estão associadas à anemia de Fanconi (PASQUINI, 1991; WINTROBE, 1993; RAPPEPORT e BUNN, 1994).

Tabela 1. Classificação etiológica das anemias aplásticas

Adquiridas	Constitucionais
Anemia aplástica secundária - radiação - drogas - agentes químicos - doenças imunes	Anemia de Fanconi Anemia aplástica familiar
Anemia aplástica idiopática	

É importante que a anemia aplástica seja classificada quanto à sua gravidade, pois a mesma está diretamente relacionada com o tempo de sobrevida do paciente.

O “International Aplastic Anemia Study Group” introduziu os seguintes critérios hematológicos para definir a forma mais grave de anemia aplástica, que é a anemia aplástica severa (AAS) (CAMITTA *et al.*, 1979; PASQUINI , 1995):

Sangue periférico: neutrófilos < 500/ $\mu$ L

plaquetas < 20.000/ $\mu$ L

reticulócitos corrigidos < 1% na presença de anemia

Medula óssea: hipocelularidade grave (25% da celularidade normal)

hipocelularidade moderada (30% de células hematopoéticas residuais ou 25 a 50% da celularidade normal).

A anemia aplástica severa é definida quando pelo menos dois destes critérios estão presentes no sangue periférico e um na medula óssea.

Aproximadamente 50% dos pacientes com AAS recebendo tratamento de suporte morrem por hemorragia ou infecção de 3 a 6 meses após o diagnóstico, e menos de 20% sobrevivem 5 anos (WINTROBE, 1993; PASQUINI, 1995).

## 1.2. ETIOLOGIA

As anemias aplásticas podem ser causadas por agentes físicos ou químicos, drogas, vírus e podem ou não ser mediadas por um mecanismo imune. Na tabela 2 estão relacionadas algumas das possíveis causas das anemias aplásticas adquiridas (PASQUINI, 1991).

Tabela 2. Algumas causas da anemia aplástica adquirida

---

<b>Drogas</b>
cloranfenicol
fenilbutazona
anticonvulsivantes
sulfonamidas
cimetidina
<b>Radiação ionizante</b>
<b>Agentes químicos</b>
benzeno e seus derivados
<b>Vírus</b>
vírus Epstein-Barr
vírus das hepatites
<b>Anemia aplástica idiopática</b>

---

Apesar de ser notoriamente conhecido que agentes químicos, físicos e biológicos podem provocar anemia aplástica é difícil estabelecer quando um deles em especial é o causador da doença. Isto não é só devido à baixa incidência da aplasia após a exposição, mas também à falta de consenso entre as estimativas realizadas e ainda à exposição simultânea a outros agentes (YOUNG, 1987; RIBEIRO, 1993). Estes fatores impedem que se determine com

precisão qual o agente causador da doença, implicando em que a grande maioria dos casos adquiridos seja de origem desconhecida, estando em torno de 40% e 70% nos Estados Unidos e na Europa, respectivamente (CAMITTA, STORB e THOMAS, 1982).

Várias drogas amplamente empregadas na clínica médica podem causar anemia aplástica entre suas reações adversas. Entre estas encontra-se um antibiótico de amplo espectro e de emprego generalizado: o cloranfenicol. Este pode causar anemia aplástica atuando de duas maneiras. Primeiro, sua atuação pode ser dependente da dose usada, o que levaria a uma supressão medular reversível. Segundo, esta droga pode agir independente da dose administrada, resultando em lesão grave da medula óssea e freqüentemente fatal. Este quadro pode ocorrer semanas ou meses após a interrupção do tratamento (WINTROBE, 1993).

Outras drogas capazes de induzir à anemia aplástica são as sulfonamidas, os anticonvulsivantes e a fenilbutazona. Nestes casos a reação é rara e o mecanismo de ação é desconhecido, mas parece estar relacionado com a susceptibilidade individual, porque não existe uma clara associação com a quantidade de droga administrada ou com a freqüência do uso (PASQUINI, 1991; RIBEIRO, 1993).

A cimetidina, empregada regularmente na clínica médica, está entre os agentes capazes de induzir à granulocitopenia e a pancitopenia. Esta relação é

preocupante pois o uso desta droga poderia ser precursor à anemia aplástica (CHANG e MORRISON, 1979).

O benzeno e seus derivados estão entre as substâncias químicas de maior destaque normalmente associadas com esta doença. O composto acima referido é amplamente usado como solvente e por sua alta volatilidade é facilmente absorvido pela via respiratória sendo no entanto, pobremente absorvido por via cutânea. O mecanismo pelo qual a doença é desencadeada é desconhecido e, normalmente, o processo é reversível (WINTROBE, 1993).

A hepatite viral também pode estar relacionada à indução da anemia aplástica. Aproximadamente 300 casos de anemia aplástica precedidas por esta virose foram descritos e acredita-se que 0,1 a 0,2% dos casos de hepatite viral desenvolvam anemia aplástica (PASQUINI, 1991). Em muitos casos a hepatite é não-A, não-B, não-C e não-G (YOUNG e MACIEJEWSKI, 1997). O vírus Epstein-Barr, causador da mononucleose infecciosa, é outro agente viral que raramente está associado à indução da anemia aplástica (WINTROBE, 1993).

Outra categoria capaz de provocar anemia aplástica é a dos agentes físicos, dentre os quais os raios X assumem papel de destaque. Uma exposição excessiva a estes, muitas vezes resultado de acidentes ou de uso terapêutico indiscriminado, pode resultar em anemia aplástica sendo freqüentemente fatal. Nestes casos, pode ocorrer desde uma microssupressão medular até uma aplasia grave dependendo da dose recebida (RAPPEPORT e BUNN, 1994).

Tem-se também, relacionado a anemia aplástica com a gestação. E nestes casos se observa uma melhora ou total ausência da doença quando termina a gestação, sugerindo que talvez ocorra a produção de um agente capaz de inibir a hematopoese durante a gravidez (SUDA *et al.*, 1978; MELETIS *et al.*, 1998).

Em um pequeno número de pacientes portadores de anemia aplástica pode-se observar a presença de uma doença associada, o que auxilia na determinação da etiologia. Entre estas doenças está a hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), a qual é causada por uma deficiência adquirida na expressão de uma proteína de membrana celular dos eritrócitos. Esta doença é caracterizada por anemia hemolítica crônica, trombocitopenia e/ou leucopenia. Aproximadamente 25% dos pacientes com HPN desenvolvem anemia aplástica. Por outro lado, pacientes com anemia aplástica podem no decorrer da doença evoluir para HPN. A relação exata entre estes dois distúrbios não é clara, porém parece que o clone anormal de células associadas à HPN pode ter origem em uma célula tronco já lesada ou ter resultado da mesma lesão que determinou a aplasia (CAMITTA, STORB e THOMAS, 1982; SCHREZENMEIER *et al.*, 1995).

Apesar de vários agentes, como os descritos até agora, serem antecessores à anemia aplástica, aproximadamente 50% dos casos possuem uma etiologia desconhecida, sendo, portanto, consideradas como idiopáticas (WINTROBE, 1993).

com anemia aplástica, o número de colônias desenvolvidas aumentava, o que corrobora a hipótese da participação do  $\text{INF}\gamma$  na patogenia da anemia aplástica (ZOUMBOS *et al.*, 1985). Esta mesma ação desencadeada pelo  $\text{INF}\gamma$  é observada para o fator de necrose tumoral (TNF). Estes,  $\text{INF}\gamma$  e TNF são duas citocinas capazes de inibir a formação de colônias hematopoéticas e a proliferação de progenitores hematopoéticos *in vitro*. Esta supressão é maior quando estas citocinas são secretadas diretamente no microambiente medular do que quando adicionadas à cultura celular. O  $\text{INF}\gamma$  e o TNF suprimem a hematopoese por efeitos sobre o ciclo celular e por afetar a viabilidade destas células (YOUNG e MACIEJEWSKI, 1997).

Outros estudos visando esclarecer a participação do sistema imune na fisiopatia da anemia aplástica tentam corroborar a associação entre o antígeno HLA-DR2 e esta doença. Apesar do aumento da frequência deste antígeno no grupo de pacientes com anemia aplástica, independente da etnia, sugerir seu envolvimento, os dados obtidos nos poucos estudos realizados não comprovam esta hipótese (NAKAO, 1992; MINER *et al.*, 1994; MELO, M. F., 1996; PEREIRA *et al.*, 1999).

A anemia aplástica ainda não está comprovada como sendo uma doença autoimune, e maiores informações são necessárias para a compreensão de sua patogenia. Para a comprovação do mecanismo autoimune, deveria ser encontrado um anticorpo específico dirigido para uma determinada célula ou para algum componente celular (PASQUINI, 1991).

O microambiente da medula óssea e as interações anormais entre células-tronco podem estar envolvidos no desenvolvimento da patogênese da anemia aplástica, mas não há comprovação de que o microambiente medular seja o responsável direto por esta doença (PASQUINI, 1991).

## 2. ANEMIA APLÁSTICA SEVERA - TRATAMENTO

### 2.1. TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

#### 2.1.1. Aspectos gerais

O transplante de medula óssea (TMO) é a transfusão de células-tronco hematopoéticas do doador para o receptor. Após o transplante, estas células que apresentam hematopoese normal e que são imunocompetentes, têm a função de repopular e reconstituir o sistema hematopoético do paciente.

O primeiro uso do TMO no tratamento de doenças humanas foi realizado em 1891 por Brown-Sequard, mas apenas em 1896 este procedimento foi descrito por Quine, consistindo na administração por via oral de células medulares. Em 1937, injeções intramusculares de aspirados de medula óssea, autólogo ou alogênico, foram utilizados por Schretzemayr, com algum sucesso, em pacientes acometidos por infecções (citados por BARRET e TRELEAVEN, 1992).

Em 1944, Bernard utilizou aspirados de medula óssea alogênico e injetou diretamente na cavidade medular obtendo resultados pobres (citado por BENJAMIN, 1995). O primeiro relato de infusão intravenosa de aspirados de medula óssea data de 1939 quando OSGOOD, RIDDLE e MATHEWS fizeram uso desta via para tratar pacientes com AAS, entretanto este procedimento foi ignorado por vários anos.

As graves conseqüências hematológicas decorrentes da irradiação durante a Segunda Guerra Mundial serviram de estímulo para as pesquisas que apontavam o TMO como um potencial tratamento para as vítimas de irradiação (BARRET e TRELEAVEN, 1992). Esta idéia foi prontamente aceita por clínicos experimentais que visualizaram a possibilidade de cura de doenças hematopoéticas humanas. No entanto, os problemas enfrentados pelos clínicos desta época eram muitos e dificultavam o emprego generalizado do TMO (BARRET e TRELEAVEN, 1992; BENJAMIN, 1995).

Um dos pioneiros no desenvolvimento do TMO como procedimento clínico foi George Mathé (1959 - citado por BENJAMIN, 1995) que pela primeira vez utilizou uma grande dose de radiação para destruir as células malignas do paciente antes do procedimento do TMO e, também, foi o primeiro a usar técnicas cirúrgicas estéreis durante esta prática. Além disso, foram Mathé *et al.* (1963) os primeiros a descreverem a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) em humanos (citado por BENJAMIN, 1995). Outro pioneiro nesta área foi Donald Thomas (1957), que utilizando cachorros como modelos

experimentais, analisou o procedimento do transplante. Este autor também foi o primeiro a introduzir o uso do metotrexato na tentativa de prevenir a DECH (citado por BARRET e TRELEAVEN, 1992; BENJAMIN, 1995).

Apesar do crescente otimismo em relação ao TMO, este não correspondeu às expectativas até meados de 1970, em parte devido ao desconhecimento dos aspectos imunológicos dos transplantes no que se referia aos antígenos de histocompatibilidade e à doença da DECH.

Os avanços metodológicos possibilitaram que o TMO fosse realizado entre indivíduos histocompatíveis, viabilizando o seu uso com sucesso no tratamento da AAS e outras doenças (BARRET e TRELEAVEN, 1992). Entre estes avanços estão a caracterização das moléculas do sistema de antígenos leucocitários humanos (*human leukocyte antigen* - HLA), as quais são codificadas por genes localizados no complexo principal de histocompatibilidade (CPH) por Van Rood (1958), Payne (1964) e Dausset *et al.* (1965) (citados por BENDER, 1991; ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1994) e o trabalho de Terasaki em 1964 que miniaturizou a técnica de linfocitotoxicidade para tipificação dos antígenos HLA (citado por BARRET e TRELEAVEN, 1992).

O aspecto imunológico teve um grande impulso com a comprovação de que transplantes entre indivíduos com genótipo HLA idênticos possuem um maior tempo de sobrevida (BENDER, 1991; BARRET e GORDON, 1993; MARTIN, 1994). Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas

laboratoriais usadas na tipificação do sistema HLA, compreendendo os locos A, B e DR, tornou-se possível uma melhor seleção dos doadores de medula óssea.

O primeiro transplante de medula óssea histocompatível realizado com sucesso é datado de 1968, quando a Universidade de Minnesota e a Universidade de Wisconsin, USA, trabalhando independentemente, usaram esta técnica para tratar duas crianças com síndrome de imunodeficiência grave. Cada paciente recebeu medula óssea de um irmão histocompatível, pois estudos em animais demonstravam que a DECH não era tão grave quando os antígenos do CPH eram iguais. Thomas *et al.* (1972), tiveram sucesso, empregando o TMO para o tratamento de quatro pacientes com AAS usando doadores fenotipicamente idênticos (citado por STORB *et al.*, 1984). Esta identidade fenotípica era determinada através de métodos sorológicos para os antígenos HLA-A, B e DR (BENDER, 1991; BARRET e TRELEAVEN, 1992; MICKELSON e HANSEN, 1995).

Conforme ABBAS, LICHTMAN e POBER (1994), os imunologistas da área de transplante costumam rotineiramente classificar os transplantes em três tipos:

Transplante autólogo: quando o paciente, após adequado tratamento, recebe infusão da sua própria medula óssea previamente aspirada e criopreservada;

Transplante singênico: quando o transplante é realizado entre indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos monozigóticos) e,

Transplante alogênico: quando o transplante é efetuado entre indivíduos que são geneticamente diferentes mas pertencem à mesma espécie.

A partir da década de 70, constatou-se uma explosão de conhecimento na área do TMO, decorrente da experiência clínica acumulada nos milhares de transplantes realizados. Isto possibilitou um melhor entendimento e controle das complicações, elegendo o TMO como a modalidade de tratamento de escolha aos pacientes em condições de submeterem-se a este procedimento (PASQUINI, 1991).

O procedimento do TMO pode ser dividido em quatro fases, sendo que a primeira consiste em selecionar um doador, a segunda no condicionamento do paciente, a terceira no TMO propriamente dito e a quarta e última no controle das complicações pós-transplante.

#### 2.1.2. Critérios de seleção de doadores para TMO alogênico

O transplante alogênico usualmente é realizado entre irmãos HLA idênticos, mas quando isto não é possível outro membro da família que seja totalmente ou parcialmente compatível pode ser usado como doador de medula

óssea. Na inexistência de doadores no núcleo familiar é realizada a busca de um doador não consangüíneo em registros nacionais e internacionais de doadores voluntários de medula óssea.

Atualmente, o processo de seleção dos doadores de medula está baseado na identidade fenotípica para os antígenos HLA-A e HLA-B através de métodos sorológicos e na identidade genotípica para alelos HLA-DRB1 definida através de técnicas de biologia molecular.

### 2.1.3. Condicionamento

Este termo é usado para definir o período, normalmente de sete dias, que antecede o TMO. Durante este período o paciente é submetido a um tratamento que tem por finalidade propiciar a imunossupressão adequada aos pacientes com AAS, criando um ambiente apropriado para que as células transplantadas se desenvolvam normalmente.

As células-tronco pluripotentes do doador são infundidas por uma veia central e dirigem-se à cavidade medular do receptor, onde se depositam e dividem-se, restabelecendo todos os tecidos hematopoéticos, imunes e de suporte (BARRET-LEE, 1995; BENJAMIN, 1995).

A ciclofosfamida (CFA), o bussulfan (BUS), a globulina antitimocítica (GAT) e a irradiação são alguns dos agentes disponíveis para o condicionamento. Para os pacientes com AAS, a CFA e o BUS estão entre os

agentes condicionantes mais empregados. A tendência para diminuir o uso da irradiação no regime condicionante deve-se aos efeitos colaterais na maioria das vezes irreversíveis (PASQUINI, 1991; BITENCOURT *et al.*, 1996).

No Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (STMO-HC/UFPR) atualmente são utilizados dois esquemas diferentes de condicionamento para os pacientes com AAS. Esta diferença é dependente do número de transfusões de hemoderivados recebidos previamente ao procedimento:

- pacientes com menos de quinze transfusões: ciclofosfamida 200 mg/kg de peso, dividido em quatro doses e.
- pacientes com quinze ou mais transfusões: bussulfan 12 mg/kg de peso dividido em 16 doses e ciclofosfamida 120 mg/kg de peso dividido em duas doses.

De acordo com BITENCOURT *et al.* (1996), a diferença no esquema de condicionamento deve-se ao elevado número de rejeições do enxerto após o TMO (42%) observados naqueles pacientes que tinham mais de quinze transfusões e que receberam apenas ciclofosfamida. O acréscimo do bussulfan reduziu para apenas 7% o índice de rejeição. Este esquema foi adotado desde que PASQUINI (1991) demonstrou que o número de transfusões é a variável de maior importância nas rejeições.

#### 2.1.4. Indicações

O TMO é a melhor e mais bem sucedida forma de tratamento para várias doenças e para pacientes jovens com AAS que possuem doador HLA idêntico. Com a presença deste doador, o índice de mortalidade entre os pacientes com AAS pode ser reduzido para 15-30% com o transplante de medula óssea (STORB *et al.*, 1983; BUSS, 1987; FALCÃO, 1987; CAMITTA *et al.*, 1975 e 1989; LOCATELLI *et al.*, 1991). Entretanto, apenas 30-40% dos pacientes com AAS possuem um doador nestas condições.

O diagnóstico de anemia aplástica deve ser o mais precoce possível, pois a idade é outro fator limitante para o emprego do TMO. Normalmente, esta prática é usada em pacientes com idade inferior a 50 anos. Especialmente para aqueles com AAS, após a opção pelo TMO, este procedimento deve ser realizado sem demora devido ao alto risco de infecções fatais (PASQUINI, 1991; STORB, 1995b).

#### 2.1.5. Complicações pós-transplante

Os pacientes com AAS que se beneficiam do TMO como forma de tratamento da doença correm o risco de serem acometidos por graves complicações decorrentes desta prática. A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), a rejeição e as infecções estão entre as principais complicações associadas ao TMO tanto na AAS como em outras doenças.

A DECH é maior em pacientes que recebem a medula óssea de doadores, consangüíneos ou não consangüíneos, parcialmente compatíveis. A DECH ocorre quando os linfócitos T maduros do doador reconhecem diferenças entre os antígenos principais de histocompatibilidade no receptor. Entretanto, diferenças nos antígenos secundários de histocompatibilidade também podem desencadeá-la. Esta doença, secundária ao transplante, pode ter manifestação aguda ou crônica, e este é o fator que mais tem influenciado a sobrevida pós-transplante (STORB *et al.*, 1983; REISNER, 1987; CAMITTA *et al.*, 1989; MION, 1994). A fase aguda da DECH é caracterizada pelo aparecimento dos sintomas entre 15 e 70 dias pós-transplante e, de acordo com a gravidade, é dividida em graus I a IV. No início, os sintomas são semelhantes ao de uma gripe acompanhada de erupção cutânea. Os graus II a IV têm uma forte influência na sobrevida dos pacientes transplantados (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1994; MELO, S. F., 1996). De acordo com STORB *et al.* (1983), a probabilidade de sobrevida é de 11 anos para 45% dos pacientes com DECH variando entre os graus II e IV, em comparação com mais de 80 % entre pacientes com grau I de DECH aguda.

Quando a DECH ocorre 100 dias após o procedimento do TMO, a fase crônica é caracterizada. Neste estágio ocorre um aumento da deposição de colágeno acarretando esclerose e atrofia da derme. Normalmente o sistema músculo-esquelético é envolvido. Vários estudos relacionam uma maior incidência da DECH crônica com uma DECH aguda prévia ou com o uso de

cremes leucocitários (McGLAVE *et al.* , 1987; CAMITTA *et al.*, 1989; STORB, 1994, 1995a). Em torno de 20 a 40% dos pacientes que sobrevivem mais que 100 dias pós-transplante desenvolvem DECH crônica, sendo que destes, aproximadamente 12% morrem em decorrência de infecções associadas à DECH crônica (PASQUINI, 1991).

É importante para a sobrevivência do paciente que a DECH seja controlada e, como esta possui uma base imunológica, terapias de imunossupressão são empregadas para prevenir o seu aparecimento. O emprego de ciclosporina A constitui um método alternativo de profilaxia da DECH mas, de maneira igual ao que acontece com o metotrexato, não previne totalmente o seu aparecimento (MION, 1992). O STMO-HC/UFPR utiliza até o dia +50 pós-transplante, a dose diária de 12 mg/kg de peso de ciclosporina A . Após 50 dias, retira 5% da dose por semana até atingir um ano, passando a uma diminuição lenta até ser retirada totalmente. O período que o paciente fica fazendo uso deste medicamento acaba sendo em torno de um ano e seis meses (BITENCOURT, 1999).

Os mecanismos imunes envolvidos na rejeição do enxerto são de natureza complexa e ainda não estão completamente elucidados. O aumento no índice de rejeição está indiretamente relacionado com o grau de histocompatibilidade. No início dos anos 70, a rejeição do enxerto era considerada a principal causa de falha nos transplantes (STORB, 1994). Em indivíduos transfundidos, a probabilidade de rejeitar o enxerto é maior, sendo

que naqueles que não recebem transfusões prévias este índice é menor que 10% (McGLAVE *et al.*, 1987; PASQUINI, 1991).

A rejeição pode ocorrer em dois estágios: precoce ou tardio. É difícil definir exatamente quando a rejeição é precoce ou tardia. É muito importante clinicamente estabelecer que já havia ocorrido a pega do enxerto e que este está sendo rejeitado (PASQUINI, 1991; STORB, 1994). A pega de um enxerto é definida pela contagem de granulócitos, que deve ser maior ou igual a 500 granulócitos/ $\mu$ L por três dias consecutivos (IBMTR, 1997). No STMO-HC/UFPR, quando esta contagem não é atingida até 26 - 28 dias pós-transplante é caracterizada a falha primária de pega do enxerto, que tem péssimo prognóstico (BITENCOURT, 1999).

Os pacientes acometidos por rejeição podem ser recuperados por um segundo transplante ou com o uso de imunossupressores.

A ocorrência de infecções no pós-transplante é freqüente devido ao sistema imune dos pacientes estar comprometido. Infecções por bactérias, fungos e vírus são comuns. Com o uso de antibióticos, as infecções bacterianas passaram a ter mais controle, reduzindo-se a mortalidade (PASQUINI, 1991; ALJURF *et al.*, 1999; YECH *et al.*, 1999). Dentre as infecções virais, a ocasionada por citomegalovírus é a mais preocupante pois é a maior causa de pneumonia intersticial. Apesar da baixa incidência desta infecção nos pacientes com anemia aplástica quando comparada à incidência em pacientes com outras doenças, este tipo de infecção é considerada a

mais preocupante devido ao alto índice de mortalidade entre os pacientes com anemia aplástica submetidos ao TMO (STORB, 1994; PASQUINI, 1995).

As infecções fúngicas, particularmente por *Candida sp* e *Aspergillus sp*, merecem atenção pois, não existe um antifúngica ideal para o controle destas (YOUNG, 1994; PASQUINI, 1995; MACHIDA et al., 1999; JANTUNEN et al., 2000).

## 2.2. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Quando o paciente com AAS não é um candidato para o TMO, terapias alternativas são adotadas na tentativa de erradicar a doença e reconstituir a hematopoese. Entre estas terapias alternativas, as imunomoduladoras com GAT e globulina antilinfocítica (GAL) são apropriadas. O mecanismo de ação exato destes dois agentes é desconhecido, podendo atuar tanto como imunossupressor quanto como imunoestimulador. A melhora é observada em aproximadamente 40-80% dos casos dos pacientes tratados com diferentes preparações de GAL, embora 10 a 20% dos mesmos apresentem uma recidiva da doença (CHAMPLIN et al., 1984; GASCON, 1985; CHAMPLIN, 1987; CAMITTA et al., 1989).

O crédito para a descoberta da terapia imunossupressora no tratamento da anemia aplástica é conferido a Mathé, que na década de 60 usou a GAL no condicionamento de pacientes e observou que ocorria regeneração autóloga

da medula óssea (citado por BARRET e TRELEAVEN, 1992; BENJAMIN, 1995).

O emprego destes agentes ocasionou um aumento significativo na sobrevivência dos pacientes, que atingiu 40 a 70% no primeiro ano de vida, comparados a apenas 20%, no mesmo período, quando tratados com andrógenos (SPECK *et al.*, 1986). A imunossupressão com GAL é considerada em muitos locais o tratamento de escolha para pacientes que não são candidatos ao TMO. Entretanto, ele tem sido associado a inúmeros efeitos colaterais como febre, calafrios, erupção cutânea, trombocitopenia e hipotensão (WINTROBE, 1993). Estudos comparativos entre o tratamento desta doença com o TMO e a GAL apresentaram uma vantagem do transplante em pacientes com idade inferior a 20 anos (sobrevivência de dois anos: 79% vs. 40%). Para os pacientes com idade superior a 35 anos a prática do TMO mostrou-se nitidamente inferior ao tratamento com GAL (sobrevivência de dois anos: 20% vs. 61%). Na faixa etária intermediária (20 a 35 anos), os estudos demonstraram uma sobreposição de resultados com os dois tipos de tratamento (CHAMPLIM, 1987).

O STMO-HC/UFPR tem utilizado a combinação de dois imunossupressores - prednisona e ciclosporina A - como tratamento alternativo para pacientes que não são candidatos ao TMO, por não apresentarem um doador HLA compatível. Dentre os 101 pacientes submetidos a este regime de imunossupressão, 48% apresentaram uma correção parcial ou completa das

contagens hematológicas e não necessitaram mais de transfusões sangüíneas e/ou antibióticos; 15% apresentaram alguma melhora nas contagens hematológicas, mas ainda dependiam de transfusões sangüíneas e/ou antibióticos e, 37% não apresentaram modificações dos valores hematológicos iniciais ou demonstraram piora. As respostas foram avaliadas seis semanas após o início do tratamento e, posteriormente, aos três, seis e doze meses (BITENCOURT *et al.*, 1995).

### 3. REPOPULAÇÃO DO SISTEMA HEMATOPOÉTICO NO PÓS-TRANSPLANTE

A determinação da origem das células que promovem a repopulação do sistema hematopoético do paciente após o transplante alogênico de medula óssea é importante, não só pelo fato de confirmar o sucesso do procedimento, mas também por auxiliar na interpretação das interações que estão ocorrendo entre as células do sistema imune do paciente e do doador. A ocorrência de quimerismo, isto é, a coexistência de células de origem tanto do doador quanto do receptor, não significa que necessariamente irá ocorrer a falha do enxerto. A presença de células no sangue periférico ou na medula óssea oriundas apenas do doador é correlacionada com o sucesso do procedimento do TMO e, neste caso, ocorreu quimerismo completo. Se forem detectadas apenas células provenientes do paciente no pós-transplante, isto indica que o procedimento

não foi bem sucedido e que houve uma recuperação autóloga da medula óssea e, neste caso, ocorreu ausência de quimerismo. As recidivas normalmente estão associadas a um quadro clínico constituído de sintomas característicos mas que não se manifestam imediatamente e, para o clínico, o diagnóstico precoce de que o procedimento não alcançou o sucesso esperado é de grande relevância (BRETAGNE *et al.*, 1987; LEEUWEN *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1994 a e b; LECLAIR *et al.*, 1995; GOMEZ *et al.*, 1997; OZBEK *et al.*, 1997).

Infelizmente, os tradicionais sistemas genéticos polimórficos, como antígenos eritrocitários, alotipos de imunoglobulinas e marcadores citogenéticos, não podem ser freqüentemente usados para detectar a repopulação do sistema hematopoético, pois têm uma sensibilidade limitada ou, muitas vezes, seriam não informativos (SCHWARTZ *et al.*, 1995).

Atualmente, a origem das células responsáveis pela repopulação do sistema hematopoético do paciente no pós-transplante é determinada através do emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para vários locos localizados em regiões hipervariáveis do genoma humano. A aplicação destes procedimentos metodológicos para a avaliação da recuperação do sistema hematopoético no pós-transplante será avaliado com mais propriedade na Discussão deste trabalho.

#### 4. REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO GENOMA HUMANO

Estas regiões contém seqüências repetitivas localizadas nos introns e flanqueadas por regiões altamente conservadas. Estas seqüências são marcadores genéticos e, seus alelos segregam de acordo com os padrões mendelianos e apresentam expressão codominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; ROSTEDT *et al.*, 1996). Estas seqüências podem ser classificadas em:

- satélites: repetições variando entre 5 e 100 pares de bases localizadas em regiões heterocromáticas do genoma humano (TYLER-SMITH e WILLARD, 1993; DEBRAUWERE *et al.*, 1997),

- minissatélites: repetições variando entre 8 e 70 pares de bases (LECLAIR *et al.*, 1995; WHEAT, 1996) e,

- microsatélites: repetições variando entre 2 e 7 pares de bases. Estas seqüências repetitivas também podem ser denominadas de seqüências repetitivas simples - SSR = *simple sequence repeats* - (BUDOWLE *et al.*, 1991a; MÖLLER e BRINKMANN, 1994 e 1995; KORETH, O'LEARY e McGEE, 1996) .

Micro e minissatélites são similares quanto ao seu valor informativo e são encontrados nas regiões eucromáticas do genoma humano (ARMOUR e JEFFREYS, 1992). Entretanto, os microsatélites apresentam duas grandes vantagens: podem ser tipificados mais rapidamente que os minissatélites e, ao

contrário destes que possuem localização preferencial perto dos telômeros, distribuem-se uniformemente por todo o genoma (WEBER, 1990).

A primeira região hipervariável foi isolada ao acaso a partir de uma biblioteca genômica, quando WYMAN e WHITE (1980) observaram que um oligonucleotídeo sonda revelava um sistema com mais de 15 tamanhos diferentes. Após este relato outros sistemas similares foram observados, sempre ao acaso, em diversos genes humanos como o da insulina e do oncogene **HRAS** (BELL, SELBY e RUTTER, 1982; NAKAMURA *et al.*, 1987, 1988).

Em 1985, JEFFREYS, WILSON e THEIN descreveram formalmente o primeiro minissatélite para o genoma humano. Após seu isolamento e caracterização, comprovou-se tratar de uma seqüência de 33 pares de bases repetida quatro vezes e que estava localizada em um intron do gene humano da mioglobina. Estes autores observaram que esta repetição era similar em seqüência a outras três regiões hipervariáveis do genoma humano descritas anteriormente.

Várias regiões hipervariáveis do genoma humano foram sendo descobertas, mas apenas em 1987 é que a terminologia "número variável de repetições em *tandem*" (VNTR) foi introduzida por NAKAMURA *et al.*, para identificar uma seqüência genética que contém repetições em *tandem* mas que representa um único loco. E, o termo VNTR é usado como sinônimo de

minissatélite por causa da definição original baseada no tamanho da seqüência repetida (7 a 70 pb).

Os primeiros métodos empregados para o estudo destas seqüências eram baseados na análise por *Southern blotting*, utilizando sondas de oligonucleotídeos uni ou multilocais. Entretanto, esta técnica apresenta uma baixa capacidade de resolução para pequenas diferenças de tamanho entre grandes fragmentos de DNA (JEFFREYS, WILSON e THEIN, 1985). A partir da segunda metade da década de 80, vários pesquisadores demonstraram que era possível empregar a técnica da PCR para estas análises ( SAIKI *et al.*, 1988; WEBER e MAY, 1989).

Assim, surgiu uma nova classificação baseada no tamanho do fragmento amplificado pela PCR para estes locos (BUDOWLE *et al.*, 1991 b; MÖLLER e BRINKMANN, 1994 e 1995; LECLAIR *et al.*, 1995; WHEAT, 1996):

- STR (*short tandem repeats*): tamanho do fragmento amplificado entre 130 e 350 pares de bases e,

- AmpFLP (*amplified fragment length polymorphism*): tamanho do fragmento amplificado entre 350 e 1000 pares de bases.

Os STR podem, ainda, ser divididos em três sistemas de acordo com a complexidade de sua estrutura. Quando existe apenas uma única seqüência repetida e ela é regularmente intercalada na parte interna do loco, o sistema é denominado regular. Um exemplo deste tipo de sistema é o loco **TH01** que apresenta o tetranucleotídeo AATG como seqüência repetida. Entretanto, para

os alelos 8.3 e 9.3 a 6<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> repetições são incompletas, consistindo de três nucleotídeos -ATG- ao invés da repetição regular do tetranucleotídeo AATG. O loco **VWA** apresenta uma estrutura mais complexa que a maioria destes locos. Ele apresenta duas seqüências repetidas na parte interna do loco, enquanto que os demais apresentam apenas uma seqüência repetida. As duas seqüências repetidas são tetranucleotídeos- (TCTG)<sub>3 ou 4</sub> e (TCTA)<sub>n</sub>. Este loco representa um sistema STR denominado variável, pois apresenta além de uma seqüência repetida regular outra seqüência repetida que varia de posição nos diversos alelos. E, um sistema STR é considerado altamente variável quando possui uma estrutura complexa, ou seja, além da seqüência repetida regularmente possui outras seqüências repetidas que se intercalam nesta. O loco **ACTBP2** é considerado um sistema altamente variável porque podem ser encontrados três tipos diferentes de variação na sua estrutura. Os alelos menores que 259 pb apresentam a mesma seqüência repetida em comum e, esta consiste do tetranucleotídeo AAAG. Para alelos de tamanho intermediário, entre 265 e 309 pb, um hexanucleotídeo AAAAAG é encontrado além do tetranucleotídeo regular. Este hexanucleotídeo ocorre apenas uma vez em cada fragmento variando, entretanto, a sua posição. Alelos maiores que 315 pb apresentam uma estrutura bastante complexa. A análise desta estrutura revela a presença de dois hexâmeros, os quais variam sua posição dentro da sub-unidade repetida de quatro nucleotídeos. A variabilidade deste loco é

aumentada pela existência de mutações que causam inserção ou deleção nas regiões flanqueadoras (MÖLLER e BRINKMANN, 1995).

Um simples loco, formado por estas seqüências repetitivas, pode ser dividido em duas regiões distintas (figura 1). A região central, ou núcleo do loco, que contém uma curta seqüência de pares de bases, a qual é repetida diversas vezes e, normalmente é denominada "repetida". O número de repetições desta seqüência ocorre ao acaso e é o principal fator de diferenciação entre os vários alelos de um mesmo loco. De cada lado da parte central que contém o bloco de repetições, existe uma seqüência de pares de bases diferente daquela chamada "repetida", sendo denominada "região flanqueadora", a qual normalmente é conservada.

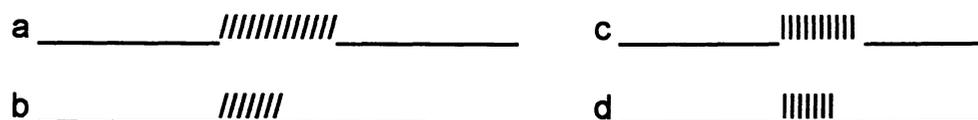


Figura 1. Modelo de um loco de seqüências repetitivas

As linhas horizontais indicam a região flanqueadora e, as linhas verticais e inclinadas indicam a seqüência "repetida" na região central do loco. As letras a e b representam alelos de um único loco, enquanto que as letras c e d representam alelos de outro loco.

As seqüências de DNA repetidas ao acaso diferem entre si em dois aspectos importantes: a natureza e o tamanho da seqüência repetida.

Freqüentemente, existem mais de dois alelos para cada loco. A princípio, o número de alelos para estes locos é ilimitado, possibilitando a

existência de vários alelos sendo cada qual raro em uma determinada população. Em humanos, para um único loco já foi documentada a presença de 80 alelos (BALAZS *et al.*, 1989).

A potencial discriminação para cada loco depende do número de alelos presente em cada loco e da capacidade de determinação destes alelos por eletroforese (TANAKA *et al.*, 1994 b; LECLAIR *et al.*, 1995).

A análise destes locos é amplamente utilizada em genética humana, animal e vegetal, por apresentarem várias características que os tornam marcadores genéticos altamente informativos. Entre estas características estão o grande número de alelos, sua alta heterozigosidade e sua freqüente ocorrência no genoma (DEKA *et al.*, 1994).

A função exata destes blocos de regiões repetitivas ainda está para ser esclarecida, mas postula-se que estejam envolvidos na regulação gênica ou que sejam “pontos quentes” de recombinação (BALAZS *et al.*, 1989; WEBER e MAY, 1989;).

Eles foram inicialmente usados no mapeamento genético, mas atualmente também são utilizados extensivamente para a construção de mapas de ligação e em estudos de associação com genes de susceptibilidade à doenças, na identificação de locos que podem estar envolvidos na carcinogênese. A descoberta destes locos revolucionou o campo da medicina forense, pois possibilitou que indivíduos possam ser identificados com maior precisão, sendo freqüentemente utilizados, por exemplo, nos casos de

comprovação ou exclusão de paternidade (DECORTE *et al.*, 1990; BUDOWLE *et al.*, 1991b; SYVÄNEM SAJANTILA e LUKKA, 1993; DEKA *et al.*, 1994; MÖLLER e BRINKMANN, 1995; SCHWARTZ *et al.*, 1995).

Outra aplicação da análise destes locos é seu uso em estudos de microevolução. Infelizmente, dados populacionais a respeito destes locos são ainda restritos para definir claramente as populações, o que dificulta o seu uso para comparações de microevolução populacional (WEBER e MAY, 1989).

Recentemente, a análise destes locos têm sido utilizada para monitorar o grau de quimerismo após o transplante de medula óssea. A determinação precoce de pega ou rejeição do enxerto, com repopulação autóloga da medula óssea, é essencial para selecionar o melhor tratamento para cada paciente. UGOZZOLI *et al.* (1991) analisaram o quimerismo no pós-transplante de treze pacientes comparando o resultado dos métodos de análise através do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP) e de regiões hipervariáveis do genoma humano por PCR, demonstrando que a sensibilidade do método que empregava a PCR era maior, pois em dois casos por RFLP o resultado foi quimerismo completo e por este último observou-se a presença de quimerismo, com aproximadamente 5% de células do paciente. Neste mesmo ano. GAIGER *et al.* (1991) demonstraram que a análise, por PCR de regiões hipervariáveis do genoma humano, do quimerismo no pós-transplante era informativo para a maioria dos pacientes analisados. Esta observação foi decorrente do estudo do quimerismo

em 26 pacientes, sendo que destes apenas quatro não puderam ser avaliados devido ao compartilhamento de alelos no loco analisado entre pacientes e doadores. GOMEZ *et al.* (1997), empregando a análise de sete locos (D1S80, 33.6, 33.1, YNZ-22, APO-B, Ig3 e DXS52) através da PCR, estudou o grau de quimerismo no pós-transplante de quinze pacientes com AAS que haviam sobrevivido além de um ano pós-tranplante. Todos os quinze pacientes tinham recebido a medula óssea de um irmão HLA compatível, mas estes pacientes eram divididos em dois grupos de acordo com o condicionamento. Nove deles receberam o condicionamento de ciclofosfamida associada à irradiação e seis receberam o condicionamento de ciclofosfamida associada à GAT. Os autores observaram que quando a GAT estava presente no regime condicionante, um quimerismo completo (recuperação alogênica) era observado em tempo menor do que quando a irradiação era usada no condicionamento. Mas, também demonstraram que a presença de quimerismo completo (recuperação alogênica), em pacientes com AAS com longo tempo de sobrevida após o transplante, é a regra tanto para regimes de condicionamento que utilizam a irradiação quanto para àqueles que fazem uso da GAT.

BOIRON *et al.* (1998), sugerem que a presença da GAT no regime condicionante para pacientes com AAS tendo como doador um irmão HLA compatível, permite completa recuperação alogênica do sistema hematopoético do paciente. Estes autores sugeriram isto após a análise do caso de uma criança com AAS submetida ao transplante tendo como doador seu irmão HLA

compatível. Fazendo uso da PCR para analisar regiões hipervariáveis do genoma humano, estes autores demonstraram a presença de quimerismo parcial aos um mês e quinze dias, aos quatro e seis meses após o procedimento. Entretanto, nova análise realizada aos vinte meses pós-transplante indicava uma completa recuperação alogênica. CASADO *et al.*(1996), avaliaram dezessete pacientes com AAS com média de quatro anos de sobrevida pós-transplante. Estes autores demonstraram que em doze destes pacientes ocorreu recuperação alogênica e nos outros cinco pacientes ocorreu a presença de quimerismo. Em dois destes cinco pacientes, havia ocorrido rejeição do enxerto. A diferença entre estes dois grupos estava no regime de condicionamento. O primeiro grupo tinha recebido condicionamento baseado em esquemas de irradiação e o segundo, somente recebeu ciclofosfamida. Estes autores sugerem que a presença de quimerismo por longo tempo pode anteceder a rejeição do enxerto em pacientes com AAS que receberam apenas ciclofosfamida no regime condicionante.

Em outras doenças, além da AAS, também tem sido empregada a análise de micro e minissatélites através da PCR na determinação das células responsáveis pela repopulação do sistema hematopoético do paciente no pós-transplante. BADER *et al.* (1998) analisaram cinquenta e cinco pacientes submetidos ao TMO utilizando esta metodologia. Dos cinquenta e cinco pacientes incluídos no estudo, vinte e um tinham diagnóstico de leucemia linfocítica aguda (LLA), vinte apresentavam diagnóstico de leucemia mielóide

aguda (LMA) e catorze apresentaram mielodisplasia (MDS). Após a análise, os autores detectaram trinta e seis casos de recuperação alogênica, sendo que, destes, sete casos recidivaram posteriormente. O intervalo entre a confirmação da recuperação alogênica e recidiva foi superior a quatro meses em quatro dos sete casos de recidiva. A presença de quimerismo foi detectada em 18 casos dos 55 estudados. Posteriormente, os autores verificaram que oito destes 18 casos evoluíram para recuperação alogênica do sistema hematopoético do paciente. E, em apenas um caso, foi verificada recuperação autóloga.

Para demonstrar a eficiência da análise de micro e minissatélites através da PCR na determinação das células responsáveis pela repopulação do sistema hematopoético do paciente no pós-transplante quando não é possível a utilização de outros marcadores, STUPPIA *et al.*(1995) fizeram uma análise retrospectiva em nove casos. Eles utilizaram a análise de quatro locos por PCR: **ApoB**, **D1S80**, **DXS52** e **D17S5**. E, em todos os casos foi possível distinguir entre células do doador e paciente. Em oito dos nove pacientes foi detectada recuperação alogênica. E, em apenas um paciente foi detectada a presença de quimerismo, sendo que este apresentou recidiva três meses após este achado. Com o mesmo propósito de demonstrar a eficiência desta metodologia, MARTINELLI *et al.* (1997) utilizaram a análise de três locos (**D1S80**, **ApoB** e **D17S5**) para avaliar a recuperação pós-transplante em seis pacientes. Destes, dois eram pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), três com LLA e um com AAS. Em todos os seis pares, as células de origem do

doador puderam ser distinguidas das de origem do paciente por pelo menos um dos três marcadores usados. A presença de quimerismo foi detectada em apenas um caso, onde posteriormente observou-se rejeição do enxerto. Em quatro dos seis casos analisados foi verificada a recuperação alogênica do sistema hematopoético do paciente e, em apenas um caso verificou-se recuperação autóloga do sistema hematopoético do paciente posterior à rejeição do enxerto.

## 5. OBJETIVOS

No início deste trabalho, na Introdução, analisou-se clinicamente a AAS ressaltando-se a importância do transplante de medula óssea como um procedimento terapêutico e dos sistemas de detecção de repopulação do sistema hematopoético no pós-transplante, por fornecerem dados auxiliares para a avaliação clínica do paciente submetido ao procedimento de TMO. Esta mesma Introdução avalia a importância do uso da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano através da PCR para detecção das células responsáveis pela repopulação do sistema hematopoético no pós-transplante em detrimento aos tradicionais sistemas genéticos polimórficos utilizados para esta finalidade. Assim, os objetivos do presente trabalho são:

1. Avaliar se a recuperação no pós-transplante ocorreu de forma autóloga, alogênica ou se ocorreu coexistência das duas subpopulações celulares resultando em quimerismo;
2. Quantificar, quando presente, o grau deste quimerismo;
3. Verificar a probabilidade de associação entre rejeição, DECH e tipos de recuperação após o TMO;
4. Verificar a probabilidade de associação entre os regimes de condicionamentos e os tipos de recuperação após o TMO;
5. Analisar a eficiência da metodologia utilizada e dos locos estudados para a identificação das células do doador e do receptor;
6. Verificar se o tipo de recuperação observada na nossa amostra depende ou não do tempo de coleta do material após o TMO.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 37 indivíduos com AAS submetidos ao procedimento do TMO desde 1983 até 1998 no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os pares receptor/doador foram selecionados de acordo com a disponibilidade para a aquisição do material biológico necessário para esta análise obedecendo os critérios, para cada par, de pertencerem ao mesmo grupo sanguíneo do sistema ABO e ao mesmo sexo, pois quando o receptor e doador eram de sexo diferente esta análise foi realizada através da citogenética. Estes critérios foram usados para a seleção de pares receptor/doador dentro do grupo onde os doadores eram irmãos HLA idênticos.

A idade média dos pacientes ao serem submetidos ao procedimento do TMO foi igual a  $23 \pm 8,4$ , variando entre 5 e 37 anos e, a idade média dos doadores na época do TMO foi de  $23,6 \pm 8,55$ , variando entre 8 e 44 anos. Todos os pares de irmãos são caucasóides sendo 29 do sexo masculino (78%) e 8 (22%) do sexo feminino. A tabela 3 apresenta as informações acima referidas de cada par de irmãos. As amostras de sangue periférico dos doadores eram coletadas quando estes compareciam ao Laboratório de Imunogenética do Serviço de Análises Clínicas da UFPR .

Tabela 3. Sexo, idade e grupo sangüíneo do sistema ABO dos 37 pares de irmãos

PARES	SEXO	IDADE DO PACIENTE	IDADE DO DOADOR	GRUPO SANGÜÍNEO
01	M	25 a	20 a	A
02	F	32 a	24 a	B
03	M	27 a	33 a	O
04	F	27 a	33 a	A
05	M	20 a	21 a	B
06	M	12 a	16 a	A
07	F	32 a	24 a	A
08	M	16 a	37 a	A
09	M	34 a	30 a	O
10	M	22 a	26 a	B
11	M	23 a	17 a	B
12	F	32 a	44 a	B
13	M	5 a	8 a	O
14	M	29 a	25 a	A
15	F	29 a	25 a	A
16	F	26 a	29 a	A
17	M	17 a	16 a	A
18	M	7 a	13 a	O
19	F	10 a	9 a	A
20	M	30 a	20 a	O
21	M	19 a	15 a	O
22	M	29 a	28 a	O
23	M	18 a	25 a	O
24	F	24 a	27 a	O
25	M	37 a	35 a	O
26	M	21 a	21 a	O
27	M	11 a	11 a	O
28	M	24 a	31 a	A
29	M	17 a	18 a	B
30	M	19 a	18 a	O
31	M	16 a	37 a	A
32	M	23 a	27 a	A
33	M	20 a	34 a	A
34	M	17 a	18 a	O
35	M	26 a	30 a	O
36	M	35 a	16 a	O
37	M	14 a	13 a	A

M = masculino

F = feminino

a = anos

O tempo médio das coletas das amostras de fios de cabelo e sangue periférico dos pacientes após o TMO foi de  $4,7 \pm 3,9$  anos, variando de três meses a catorze anos.

O regime de condicionamento empregado nestes pacientes foi ciclofosfamida 200 mg/kg de peso em 23 casos e, em 14 casos ciclofosfamida 120 mg/kg de peso mais bussulfan 12 mg/kg de peso.

A tabela 4 apresenta dados sobre o TMO de cada um dos 37 pacientes e o número de transfusões recebidas pelos mesmos.

Quanto à etiologia, a amostra é heterogênea. Em 27 pacientes (73%) dos 37 da amostra, a causa da AAS não pôde ser identificada, sendo classificadas como anemias aplásticas severas idiopáticas. Em nove casos (24,3%) existia um histórico de contato do paciente com agentes químicos, como solventes e medicamentos, anterior ao desenvolvimento de AAS, e em apenas um caso (2,7%), a AAS foi precedida por hepatite. Trinta e seis dos pacientes permanecem vivos e um foi a óbito por causa acidental.

O material biológico estudado foi o DNA. e todo o procedimento metodológico desenvolveu-se no Laboratório de Imunogenética do Serviço de Análises Clínicas da UFPR. Foram coletadas amostras de sangue periférico e fios de cabelo (aproximadamente 15 fios) dos pacientes, os quais forneceram os padrões pós-transplante e constitucional, respectivamente. Somente amostras de sangue periférico foram coletadas dos doadores.

Tabela 4. Número de transfusões, tipo de condicionamento, data do TMO e tempo de coleta do material dos pacientes após o TMO

PACIENTES	Nº DE TRANSFUSÕES	CONDICIONAMENTO	DATA DO TMO	TEMPO DA COLETA APÓS O TMO
01	16	CFA 200	25/04/83	13 a e 11 m
02	20	CFA 200	30/01/84	11 a e 8 m
03	2	CFA 200	12/12/84	11 a e 5 m
04	4	CFA 200	27/11/85	9 a e 9 m
05	61	CFA 200	18/08/86	10 a e 6 m
06	8	CFA 200	13/04/87	8 a e 7 m
07	16	CFA 200	13/07/87	8 a e 5 m
08	4	CFA 200	18/08/87	9 a e 10 m
09	34	CFA 200	26/08/87	8 a e 5 m
10	40	CFA 200	16/08/89	7 a e 3 m
11	2	CFA 200	19/12/89	7 a e 2 m
12	7	CFA 200	12/11/90	6 a e 3 m
13	20	CFA 200	06/08/91	5 a e 8 m
14	9	CFA 200	17/03/92	4 a e 11 m
15	40	CFA 200	11/08/92	4 a e 4 m
16	10	CFA 200	22/09/92	4 a e 4 m
17	24	CFA 200	07/12/92	4 a e 1 m
18	23	CFA 200 + BUS 12	28/01/93	4 a
19	11	CFA 200	11/03/93	4 a e 3 m
20	36	CFA 200 + BUS 12	08/04/93	8 m
21	14	CFA 200	16/11/93	1 a e 9 m
22	34	CFA 200 + BUS 12	18/11/93	2 a
23	58	CFA 200	08/12/93	3 a e 6 m
24	45	CFA 200 + BUS 12	27/05/94	1 a e 3 m
25	23	CFA 200 + BUS 12	24/02/95	1 a e 11 m
26	11	CFA 200	17/03/95	7 m
27	73	CFA 200 + BUS 12	29/03/95	7 m
28	35	CFA 200 + BUS 12	12/09/95	1 a e 5 m
29	21	CFA 200 + BUS 12	08/02/96	1 a e 1 m
30	82	CFA 200 + BUS 12	08/03/96	11 m
31	30	CFA 200 + BUS 12	18/03/96	9 a e 11 m
32	15	CFA 200 + BUS 12	09/05/96	8 m
33	50	CFA 200 + BUS 12	17/05/96	9 m
34	13	CFA 200	04/07/96	6 m
35	31	CFA 200 + BUS 12	28/08/96	6 m
36	10	CFA 200	26/03/97	1 a e 3 m
37	37	CFA 200 + BUS 12	20/02/98	3 m

CFA 200 = ciclofosfamida 200 mg/kg de peso; BUS 12 = bussulfan 12 mg/kg de peso; a = anos; m = meses

Convencionou-se designar, em todo o desenvolvimento deste trabalho, de pré-transplante os padrões constitucionais obtidos dos fios de cabelo dos pacientes.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Extração do DNA genômico

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue periférico em EDTA 5%, tanto dos pacientes quanto dos doadores, para a obtenção do DNA genômico. Após a coleta as amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 18.000 rpm por 15 minutos para a obtenção do creme leucocitário, o qual foi armazenado a - 20°C até o momento da extração do DNA.

Foram coletados aproximadamente 15 fios de cabelo de cada paciente. Estes foram cortados, com o auxílio de um bisturi estéril, próximos ao bulbo capilar e armazenados a - 20°C até o momento da extração.

#### 2.1.1. Extração do DNA de sangue periférico

Para a extração de DNA genômico de sangue periférico utilizou-se o método de *Salting Out*, conforme MILLER, DYKES e POLESKY (1988), com

modificações. Este método utiliza uma solução saturada de cloreto de sódio para precipitar as proteínas. As moléculas de DNA que se encontram no sobrenadante são, posteriormente, precipitadas pela adição de etanol absoluto.

1. Após o descongelamento os eritrócitos r emanescetes foram lisados através de lavados de 700  $\mu$ L com Tampão de Lise de Glóbulos Vermelhos contendo 10 mM de Tris-HCl pH 7,6; 5 mM de  $MgCl_2$ ; 1,6 M de sacarose e 5% v/v de Triton X-100. Imediatamente após cada lavado os glóbulos brancos foram recuperados através de centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos.
2. O botão leucocitário, livre de glóbulos vermelhos, era ressusitado em 80  $\mu$ L de uma solução contendo 8,10 mM de NaCl; 0,026 mM de EDTA; 0,2% de duodecil sulfato de sódio e 1,2 mg de proteinase K.
3. O material era agitado e incubado em banho seco a 60°C por 30 minutos.
4. Decorrido este tempo era adicionado, a este lisado de células brancas, solução saturada de NaCl 6M e centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos.
5. O sobrenadante era transferido para um novo microtubo e, então, lavado com etanol absoluto.
6. O material era submetido à centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos para recuperação do DNA.

7. Após precipitado, o DNA era novamente lavado com etanol 70% e deixado para secar à temperatura ambiente.
8. Em seguida, era ressuspendido em 50  $\mu$ L de água ultrapura, quantificado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.2. Extração do DNA de bulbo capilar

Para a extração do DNA genômico das amostras de fios de cabelo, o método utilizado foi o descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989) com modificações, o qual baseia-se na adição de solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) para extrair proteínas e ácidos graxos e posterior precipitação do DNA genômico pela adição de etanol.

1. Aos bulbos capilares era acrescentado 80  $\mu$ L de uma solução contendo 8,10 mM de NaCl; 0,026 mM de EDTA; 0,2% de duodecil sulfato de sódio e 1,2 mg de proteinase K ;
2. O material era homogeneizado e incubado a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
3. Após a incubação eram acrescentados 500  $\mu$ L de fenol saturado pH 8,0 e 400  $\mu$ L de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1, v/v. A agitação era realizada em *vortex*.
3. Em seguida era centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos.

4. O sobrenadante era transferido para um novo microtubo ao qual era adicionado acetato de sódio 3 M e etanol absoluto.
5. Após a precipitação, era centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos.
6. O sobrenadante era descartado e o DNA lavado com etanol 70%.
7. O DNA era deixado para secar à temperatura ambiente, ressuspenso em 50  $\mu$ L de água ultrapura, quantificado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2. Quantificação das amostras de DNA

As concentrações das amostras de DNA foram determinadas através da leitura da densidade ótica a 260 e 280 nm em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 3E e padronizadas em 12,5 ng/ $\mu$ L.

A razão entre as densidades óticas de 260 e 280 nm fornecem a pureza da amostra de DNA, a qual deve estar entre 1,65 – 1,80.

## 2.3. Amplificação do DNA.

A avaliação do padrão de regeneração do sistema hematopoético dos pacientes submetidos ao TMO foi realizada pela análise do polimorfismo de variações em número de unidades repetitivas. O método é baseado na amplificação destes locos pela PCR, seguida de eletroforese de gel de

poliacrilamida para separar os fragmentos amplificados e visualização destes com coloração com sais de prata.

A mistura de reação usada na amplificação foi de acordo com o descrito por SMITH e McFARLAND (1994). Esta mistura era composta por 0,25 µg de DNA genômico; 0,25 mM de cada dNTP; 2,5 unidades de Taq polimerase; 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,25 mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 50 µL. O MgCl<sub>2</sub> foi adicionado sob a forma de pérola de cera (marca Lumitekk) permitindo a realização da amplificação com início à quente.

As características dos seis locos estudados estão descritas na tabela 5. Estes locos localizam-se em cinco cromossomos diferentes: **D1S80** (1p); **ACTBP2** ou **SE33** (6q13); **TH01** (11q15.5); **ARA** (Xq11.2-Xq12); **33.6** (1q23) e **TPO** (2p24-2p25). Os oligonucleotídeos iniciadores específicos usados para amplificar cada loco encontram-se descritos na tabela 6. Os seis locos foram divididos em dois sistemas de amplificação, constituindo sistemas *multiplex*, cada qual amplificando simultaneamente três locos, conforme o descrito por ALONSO *et al.* (1997).

Tabela 5. Características dos locos analisados.

<b>LOCO</b>	<b>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</b>	<b>FRAGMENTO AMPLIFICADO</b>	<b>UNIDADE REPETITIVA</b>	<b>Nº DE ALELOS</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>D1S80</b> (pMC118)	1p	480-782 pb	16 pb	29	SCHWARTZ <i>et al.</i> (1995)
<b>ACTBP2</b> (SE33)	6q13	229-337 pb	4 pb	30	SCHWARTZ <i>et al.</i> (1995) LECLAIR <i>et al.</i> (1995)
<b>TH01</b> (TC11)	11q15.5	183-211 pb	4 pb	9	SCHWARTZ <i>et al.</i> (1995) LECLAIR <i>et al.</i> (1995) MÖLLER e BRINKMANN. (1995)
<b>ARA</b>	Xq11.2-Xq12	263-305 pb	3 pb	15	LECLAIR <i>et al.</i> (1995)
<b>33.6</b>	1q23	500-1000 pb	37 pb	13	LEEUWEEN <i>et al.</i> (1991) UGOZZOLI <i>et al.</i> (1991)
<b>TPO</b>	2p24-2p25	106-130 pb	4 pb	8	ANKER <i>et al.</i> (1992)

Tabela 6. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores.

LOCO		OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (5'-3')	REFERÊNCIAS
D1S80	5' 3'	gAA ACT ggC CTC CAA ACA CTg CCC gCC g gTC TTg TTg gAg Atg CAC gTg CCC CTT gC	BUDOWLE <i>et al.</i> (1991b)
ACTBP2	5' 3'	AAT CTg ggC gAC Aag AgT gA ACA TCT CCC CTA CCg CTA TA	POLYMEROPOULOS <i>et al.</i> (1992)
33.6	5' 3'	AAA gAC CAC AgA gTg Agg AgC TgT gAg Tag Agg AgA CCT CAC	UGOZOLLI <i>et al.</i> (1991)
TH01	5' 3'	gTg ATT CCC ATT ggC CTg TTC CTC gTg ggC TgA AAA gCT CCC gAT TAT	EDWARDS <i>et al.</i> (1992)
ARA	5' 3'	gCT gTg AAg gTT gCT gTT CCT CAT TCC AgA ATC TgT TCC AgA gCg TgC	EDWARDS <i>et al.</i> (1991, 1992)
TPO	5' 3'	CAC TAg CAC CCA gAA CCg TC CCT TgT Cag CgT TTA TTT gCC	ANKER <i>et al.</i> (1992)

A figura 2 ilustra a utilização da amplificação simultânea dos seis locos analisados neste estudo através de dois sistemas *multiplex*. O primeiro sistema *multiplex* contém os oligonucleotídeos iniciadores para os locos **D1S80**, **ACTBP2** e **TH01**. O segundo sistema *multiplex* contém os oligonucleotídeos iniciadores para os locos **33.6**, **ARA** e **TPO**. A análise deste caso (par nº 24) demonstra que os locos **33.6**, **ARA** e **TPO** foram não informativos, de acordo com a tabela 7. Os locos **D1S80** e **33.6** não são utilizados para a quantificação do grau de quimerismo pois estes dois locos possuem fragmentos amplificados de alto peso molecular (variando de 480 pb a 1000 pb – de acordo com a tabela 5) o que dificulta a sua amplificação podendo não reproduzir o verdadeiro grau de quimerismo. Os resultados obtidos para estes dois locos são usados apenas para orientar o tipo de recuperação (alogênica, autóloga ou quimérica).

As amostras foram submetidas a amplificação exponencial do DNA através da PCR em um termociclador Perkin Elmer 9600. O programa de amplificação utilizado era composto por 28 ciclos, cada qual consistindo de 30 segundos à 94°C e 30 segundos à 62°C. Ao término destes ciclos as amostras foram submetidas à 62°C por 20 minutos. Após a realização desta PCR, as amostras foram mantidas à 4°C até o momento da realização da eletroforese.

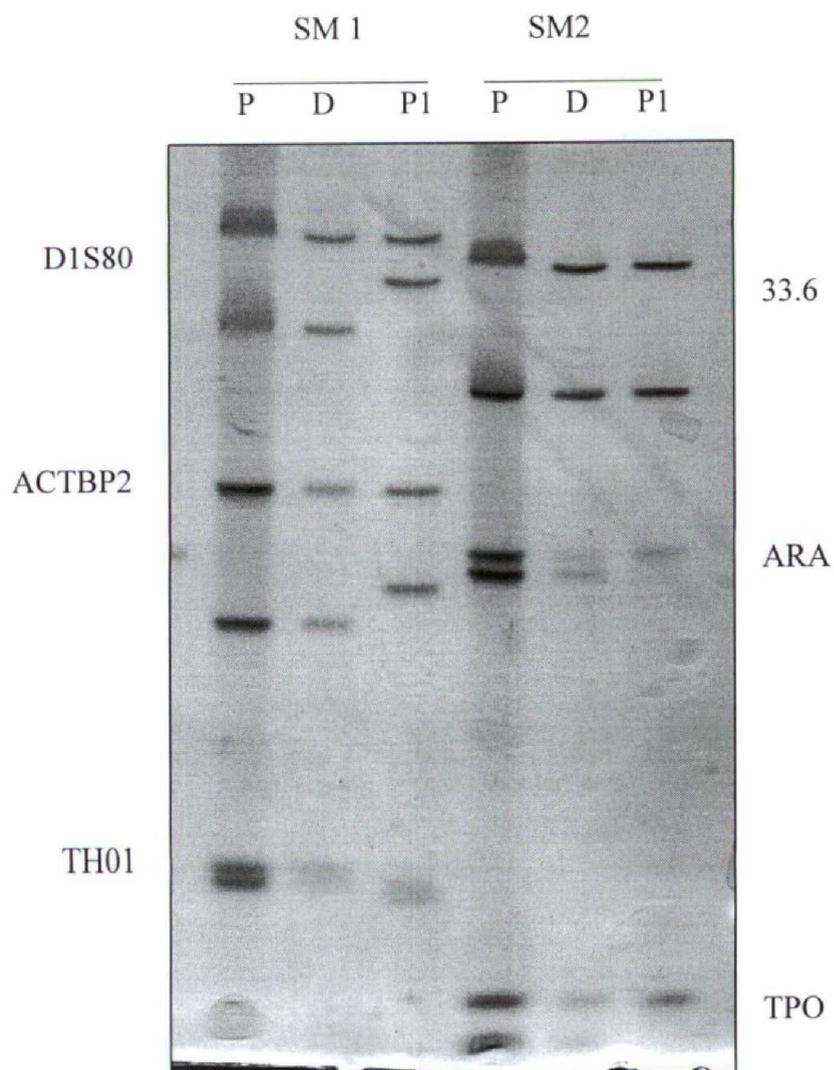


Figura 2: Padrão de recuperação alogênico através da amplificação simultânea dos seis locos utilizando sistema *multiplex* (par nº 24). SM1 = primeiro *multiplex*; SM2 = segundo *multiplex*; P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador; P1 = amostra pré-transplante.

#### 2.4. Corrida eletroforética

Os fragmentos amplificados através da reação da PCR foram separados em gel vertical e descontínuo de poliacrilamida conforme o descrito por SAJANTILA e LUKKA (1993) com modificações no que se refere às concentrações do agente *crosslinking* (C) bis-acrilamida (N N'metilenobisacrilamida).

A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba V16 (Gibco), à temperatura ambiente, a 50 V por 12 horas. O tampão de corrida usado foi TBE 1 X pH 8,5 (Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM e EDTA 2mM).

Neste procedimento foram utilizados dois géis. o inferior denominado gel de separação. O método é baseado numa menor concentração total de acrilamida (T), correspondente à concentração de acrilamida mais bis-acrilamida, no gel superior e em uma diferença entre o pH do tampão de preparo do gel e o pH do tampão de corrida eletroforética.

Primeiramente, preparava-se o gel inferior com as dimensões de 16 cm x 20 cm x 1 mm. Neste gel a concentração total (T) foi 6,4 % e a concentração do agente *crosslinking* (C) foi de 5,5%. O gel foi preparado em tampão Tris 33 mM pH 4,5 contendo 7,0% de glicerol. A esta mistura foram acrescentados 250 µL de persulfato de amônio (APS) 10% e 25 µL de N. N, N', N' tetrametiletileno diamina (TEMED).

Sobre este gel foi adicionado 1 mL de n-butanol, imediatamente antes do início da polimerização com o objetivo de linearizar o gel. O tempo para a

completa polimerização, à temperatura ambiente, foi de 45 minutos. Decorrido este tempo, o álcool foi retirado e foi acrescentado o gel superior com as dimensões de 4 cm x 20 cm x 1 mm.

A concentração total, no gel superior, foi de 3,14% e a concentração do agente *crosslinking* foi de 4,6%. Este gel também era preparado em tampão tris 33 mM pH 4,5 com glicerol a 2%. A esta mistura eram acrescentados 100 µL de APS 10% e 15 µL de TEMED. Em seguida à adição deste gel sobre o gel inferior, era colocado um pente com 20 escavações sem formar bolhas. O tempo para a polimerização deste gel, à temperatura ambiente, era de 2 horas.

#### 2.4.1. Aplicação das amostras amplificadas

Uma alíquota de 10 µL de cada amostra amplificada era misturada com 2 µL de solução de azul de bromofenol (20% de sacarose; 12,5% de ficoll; 0,2% de azul de bromofenol; 0,1 M de acetato de sódio e 1 mM de EDTA pH 8,3). Esta mistura era aplicada no gel de poliacrilamida obedecendo a seguinte ordem: amostra de DNA pós-transplante do paciente (sangue periférico), amostra de DNA do doador (sangue periférico) e amostra de DNA pré-transplante do paciente (fios de cabelo).

#### 2.4.2. Visualização dos produtos amplificados pela PCR

Após a corrida eletroforética os produtos amplificados eram visualizados através da coloração com sais de prata de acordo com SMITH (1994).

Terminada a eletroforese o gel era colocado em solução fixadora (10% de etanol e 0,75% de ácido acético), a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida era lavado 2 vezes com água bidestilada e colocado em solução de prata (nitrato de prata 2%) à temperatura ambiente por 30 minutos. Novamente era lavado 2 vezes com água bisdestilada e colocado na solução reveladora (3% de NaOH e 0,3% de formaldeído) à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a revelação o gel era deixado em solução de ácido acético a 5%, até ser fotografado em transiluminador de luz branca.

## 2.5. Interpretação dos resultados

### Loco não informativo

As amostras do paciente pré e pós-transplante e a amostra do doador apresentavam o mesmo padrão eletroforético ou a amostra do doador apresentava-se em homozigose e o referido alelo estava presente na amostra pré-transplante do paciente ou, ainda, quando a amostra pré-transplante do paciente apresentava-se em homozigose e o referido alelo estava presente também na amostra do doador.

### Loco informativo apresentando regeneração autóloga

As amostras do paciente pré e pós-transplante apresentavam o mesmo padrão eletroforético, o qual diferia do padrão eletroforético da amostra do doador.

#### Loco informativo apresentando regeneração alogênica

A amostra do paciente pós-transplante e a amostra do doador apresentavam o mesmo padrão eletroforético, o qual diferia do padrão eletroforético da amostra pré-transplante do paciente.

#### Loco informativo apresentando regeneração quimérica

A amostra do paciente pós-transplante apresentava um padrão eletroforético que refletia a coexistência de padrões eletroforéticos distintos da amostra do doador e da amostra pré-transplante do paciente. A quantificação era efetuada através de inspeção visual por análise independente por dois observadores.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do  $\chi^2$  (para avaliar a significância das diferenças nas distribuições dos resultados informativos e não informativos nos seis locos estudados), o teste exato de Fisher (para avaliar a independência entre os tipos de recuperação, alogênica e quimérica, e a ocorrência de rejeição, DECH e o tipo de condicionamento) e o coeficiente de regressão (para avaliar o grau de dependência do tipo de recuperação, alogênica e quimérica, em função do

tempo entre o TMO e a coleta do material), foram aplicados de acordo com BEIGUELMAN (1988) e PIMENTEL GOMES (1976).

### III. RESULTADOS

Considerando que em cada par de irmãos foram realizadas três reações de amplificação (do doador, do receptor pré e pós-transplante) para cada sistema *multiplex* utilizado, no total foram realizadas 222 reações de amplificação. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos. Apenas para um loco (**33.6**) em um dos pares de irmãos (nº 3) não foi possível obter resultado. Várias tentativas, por pessoas diferentes, foram efetuadas para verificar se era possível conseguir amplificação para o loco **33.6** no par nº 3 sendo todas sem sucesso. Uma das possíveis explicações para este fato, poderia ser a presença de mutações nas regiões flanqueadoras o que impossibilitaria o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e conseqüentemente a sua amplificação. Este mesmo evento já foi descrito para outros locos por MÖLLER e BRINKMANN (1995). Portanto, dos 222 procedimentos realizados para identificação de células do doador e do receptor 221 (99,55%) tiveram sucesso, sendo que 133 (60,18%) foram informativos e 88 (39,82%) foram não informativos.

Dentro de cada loco, obtivemos as seguintes freqüências de resultados informativos: **D1S80** = 75,67% (28/37); **ACTBP2** = 72,97% (27/37); **TH01** = 59,46% (22/37); **33.6** = 55,56% (20/36); **TPO** = 51,35% (19/37) e **ARA** = 45,95% (17/37).

Tabela 7. Locos informativos e não informativos

PARES	LOCOS ANALISADOS					
	D1S80	ACTBP2	TH01	33.6	ARA	TPO
1	NI				NI	
2		NI	NI	NI		
3			NI	NA		NI
4				NI	NI	
5		NI			NI	NI
6	NI		NI			NI
7		NI	NI		NI	NI
8			NI			NI
9		NI	NI			
10				NI		
11	NI	NI				NI
12						NI
13	NI	NI		NI		
14	NI					
15				NI		
16	NI	NI		NI	NI	
17				NI	NI	
18			NI			NI
19				NI	NI	
20					NI	
21		NI	NI	NI		NI
22						
23			NI	NI	NI	NI
24				NI	NI	NI
25			NI		NI	NI
26			NI	NI	NI	NI
27	NI			NI		NI
28				NI	NI	NI
29			NI	NI	NI	NI
30		NI	NI		NI	NI
31				NI	NI	
32					NI	NI
33	NI				NI	
34			NI		NI	
35			NI		NI	
36						
37	NI	NI				

I = informativo

NI = não informativo

NA = não analisado

Considerando todos os locos estudados, o **ARA** foi o menos informativo (17/133 = 12,78 %) e o **D1S80** foi o mais informativo (28/133 = 21,05 %) com uma média de  $22,17 \pm 4,45$  resultados informativos por locos. Aplicando-se aos dados da tabela 7 o teste do  $\chi^2$ , verificou-se que os resultados informativos e não informativos distribuíram-se igualmente nos seis locos estudados ( $\chi^2_5 = 10,898$ ;  $P > 0,05$ ). O número de locos informativos por pares de irmãos variou de dois (pares nº 7, 16, 21, 23, 26, 29 e 30) a 6 (pares nº 22 e 36) com uma média de  $3,59 \pm 1,12$ . Assim, todos os pares de irmãos puderam ser avaliados quanto ao tipo de recuperação e grau de quimerismo, pois o requisito adotado para este estudo era a existência de no mínimo dois locos informativos por par doador/receptor.

A tabela 8 apresenta o tipo de recuperação dos pacientes. Quatro (10,81 %) dos pacientes apresentaram recuperação autóloga (números 3, 4, 10 e 15), 18 (48,65 %) dos pacientes apresentaram recuperação alogênica (números 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 30 e 32) e 15 (40,54 %) apresentaram quimerismo (números 11, 12, 13, 19, 21, 26, 27, 28, 29, 31, 33, 34, 35, 36 e 37). A tabela 8 também apresenta informações quanto a ocorrência de DECH e rejeição nos 37 pacientes. Verifica-se que os quatro pacientes com recuperação autóloga apresentaram rejeição e um (nº 3) apresentou DECH limitado. Devido ao pequeno número destes pacientes, os mesmos não foram considerados nas análises estatísticas onde são incluídos somente os pacientes com recuperação alogênica e quimérica.

Tabela 8. Tipo de recuperação e evolução clínica dos pacientes quanto à DECH e a rejeição e data de ocorrência das mesmas

PACIENTE	TIPO DE RECUPERAÇÃO	DECH AGUDA	DATA DA DECH AGUDA	DECH CRÔNICA	DATA DA DECH CRÔNICA	REJEIÇÃO	DATA DA REJEIÇÃO
01	alogênica	0	-	limitado	12/10/83	NR	-
02	alogênica	II	24/02/84	limitado	26/04/84	NR	-
03	autóloga	0	-	limitado	10/06/90	R	10/01/96
04	autóloga	0	-	0	-	R	05/02/95
05	alogênica	0	-	extenso	10/12/86	NR	-
06	alogênica	0	-	0	-	NR	-
07	alogênica	0	-	limitado	20/09/87	NR	-
08	alogênica	0	-	limitado	03/10/89	NR	-
09	alogênica	0	-	0	-	NR	-
10	autóloga	0	-	0	-	R	13/12/90
11	quimerismo-85 a 90% doador	0	-	0	-	NR	-
12	quimerismo-90 a 95% doador	0	-	0	-	NR	-
13	quimerismo-10 a 15% doador	0	-	0	-	R	14/05/93
14	alogênica	0	-	limitado	11/05/93	NR	-
15	autóloga	0	-	0	-	R	18/12/93
16	alogênica	0	-	0	-	NR	-
17	alogênica	0	-	0	-	NR	-
18	alogênica	0	-	0	-	NR	-
19	quimerismo-90 a 95% doador	0	-	0	-	NR	-
20	alogênica	0	-	0	-	NR	-
21	quimerismo-5 a 10% doador	0	-	0	-	R	18/09/95
22	alogênica	0	-	0	-	NR	-
23	alogênica	0	-	0	-	NR	-

Continua

Continuação

PACIENTE	TIPO DE RECUPERAÇÃO	DECH AGUDA	DATA DE DECH AGUDA	DECH CRÔNICA	DATA DE DECH CRÔNICA	REJEIÇÃO	DATA DA REJEIÇÃO
24	alogênica	II	23/06/94	0	-	NR	-
25	alogênica	I	28/03/95	0	-	NR	-
26	quimerismo-90 a 95% doador	0	-	0	-	R	23/09/96
27	quimerismo-50 a 55% doador	0	-	0	-	R	17/11/95
28	quimerismo-90 a 95% doador	II	25/10/95	0	-	NR	-
29	quimerismo-80 a 85% doador	0	-	0	-	NR	-
30	alogênica	II	12/04/96	0	-	NR	-
31	quimerismo-90 a 95% doador	0	-	0	-	NR	-
32	alogênica	0	-	extenso	09/07/96	NR	-
33	quimerismo-5 a 10% doador	0	-	0	-	NR	-
34	quimerismo-15 a 20% doador	0	-	0	-	R	15/01/98
35	quimerismo-50 a 55% doador	0	-	0	-	NR	-
36	quimerismo-50 a 55% doador	0	-	0	-	NR	-
37	quimerismo-90 a 95% doador	0	-	0	-	NR	-

R = rejeição

NR = não rejeição

A tabela 9 apresenta o número de pacientes com ocorrência ou não de rejeição, de DECH e o condicionamento ao qual foram submetidos (de acordo com as informações das tabelas 4 e 8). Aplicando-se a estes dados o teste exato de Fisher, obteve-se os seguintes resultados: rejeição:  $P = 1,26\%$  significativa; DECH:  $P = 3,60\%$  significativa e condicionamento:  $P = 46,10\%$  não significativa. Portanto, para a ocorrência ou não de rejeição e DECH refutamos a hipótese nula de que independem do tipo de recuperação. Para condicionamento aceitamos a hipótese nula de que o tipo de recuperação independe do tipo de condicionamento.

Conforme apresentado na tabela 10 os pacientes com quimerismo foram divididos em dois grupos: com até 55% de células do doador e com 80 a 95% de células do doador e neles analisou-se a ocorrência ou não de rejeição, de DECH e o tipo de condicionamento. Aplicando-se a estes dados o teste exato de Fisher, obteve-se os seguintes resultados: rejeição:  $P = 10,02\%$  não significativa; DECH:  $P = 53,33\%$  não significativa e condicionamento:  $P = 59,52\%$  não significativa. Portanto, para ocorrência ou não de rejeição e DECH aceitamos a hipótese nula de que independem do grau de quimerismo. Também, aceitamos a hipótese nula de que o tipo de recuperação independe do condicionamento aos quais os pacientes foram submetidos.

Tabela 9. Número de pacientes com recuperação alogênica e quimérica analisados quanto a rejeição (A), DECH (B) e que foram submetidos a diferentes tipos de condicionamento ( C )

	RECUPERAÇÃO		Total
	Alogênica	Quimérica	
<b>A</b>			
Com rejeição	0	5	5
Sem rejeição	18	10	28
Total	18	15	33
<b>B</b>			
Com DECH	10	1	11
Sem DECH	8	14	22
Total	18	15	33
<b>C</b>			
CFA 200	11	8	19
CFA 200 + BUS 12	7	7	14
Total	18	15	33

Tabela 10. Número de pacientes com quimerismo até 55% de células do doador e com 80 a 95% de células do doador analisados quanto a rejeição (A), DECH (B) e que foram submetidos a diferentes tipos de condicionamento (C)

<b>QUIMERISMO</b>			
	Até 55 % de células do doador	80 a 95 % de células do doador	Total
<b>A</b>			
Com rejeição	4	1	5
Sem rejeição	3	7	10
Total	7	8	15
<b>B</b>			
Com DECH	0	1	1
Sem DECH	7	7	14
Total	7	8	15
<b>C</b>			
CFA 200	4	4	8
CFA 200 + BUS	3	4	7
12			
Total	7	8	15

Na última coluna da tabela 4 (Material e Métodos) é apresentado o tempo de coleta do material após o TMO. Transformando as informações em meses, observa-se que dos pacientes com quimerismo de até 55% de células do doador, com quimerismo de 80 a 95% de células do doador e dos com recuperação alogênica o material foi coletado em média  $18,86 \pm 22,37$ ;  $46,37 \pm 43,25$  e  $66,39 \pm 50,41$  meses após o TMO, respectivamente. Baseados nestas informações, avaliamos se o tipo de recuperação (quimérica com até 55% de células do doador; quimérica com 80 a 95% de células do doador e alogênica) dependia do tempo de coleta do material após o TMO. Atribuindo-se os valores 1 (quimerismo até 55%), 2 (quimerismo de 80 a 95%) e 3 (recuperação alogênica) para a variável Y e aplicando-se a análise do coeficiente de regressão obteve-se um valor de  $b = 0,0071 \pm 0,0033$ ;  $t = 2,151$ ,  $P < 0,05$ . Portanto, o valor do coeficiente de regressão é significativamente diferente de zero e positivo, indicando que os tipos de recuperação observados dependem do tempo de coleta do material após o TMO.

Nas figuras 3 a 8 são apresentados os padrões eletroforéticos de recuperação alogênica, autóloga, quimérica e não informativos nos seis locos analisados e, na figura 9 são apresentados padrões eletroforéticos com diferentes graus de quimerismo.

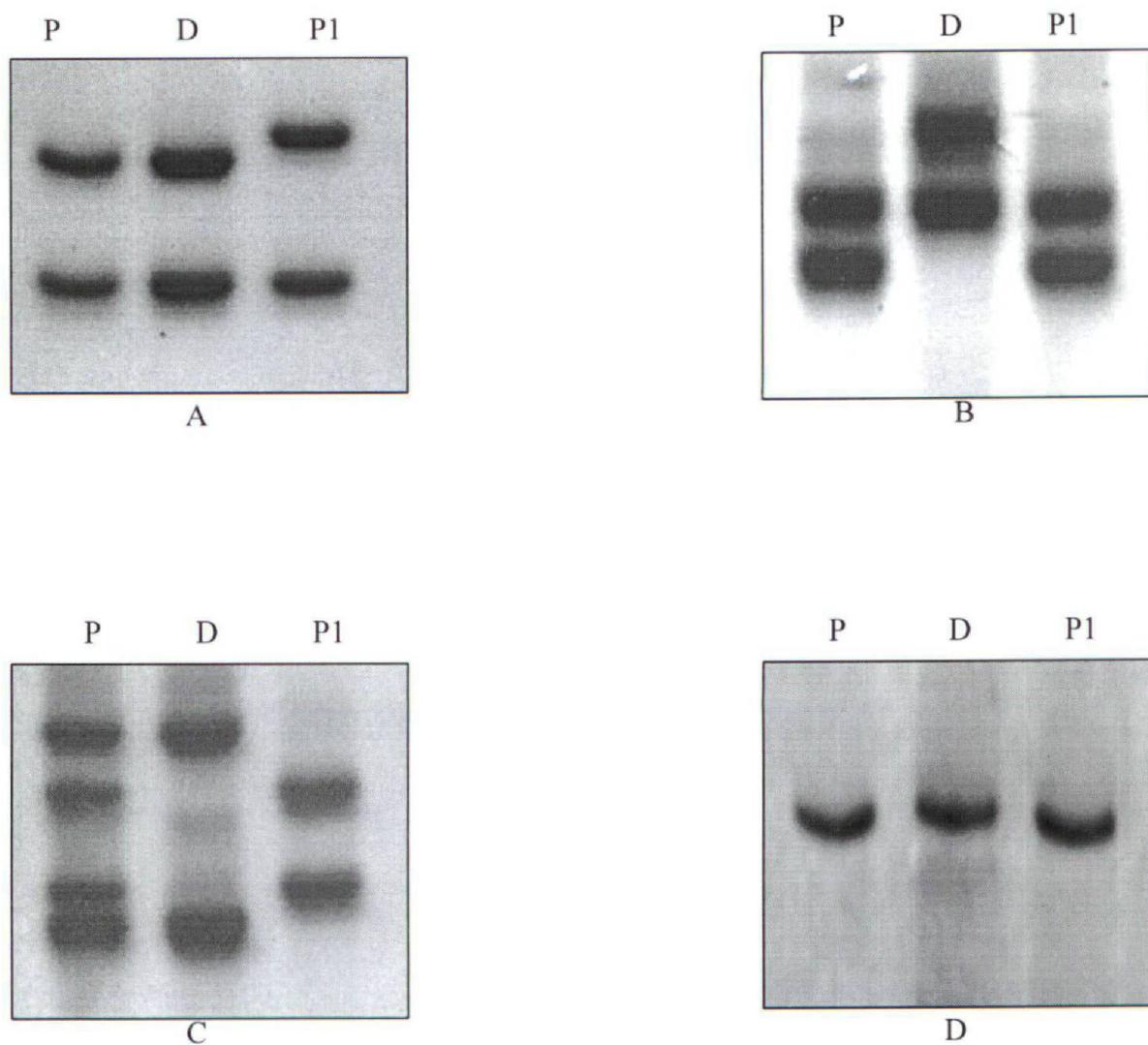


Figura 3: Loco **ACTBP2** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 14), B = recuperação autóloga (par nº 4), C = recuperação quimérica (par nº 35) e D = loco **ACTBP2** não informativo (par nº 21). P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

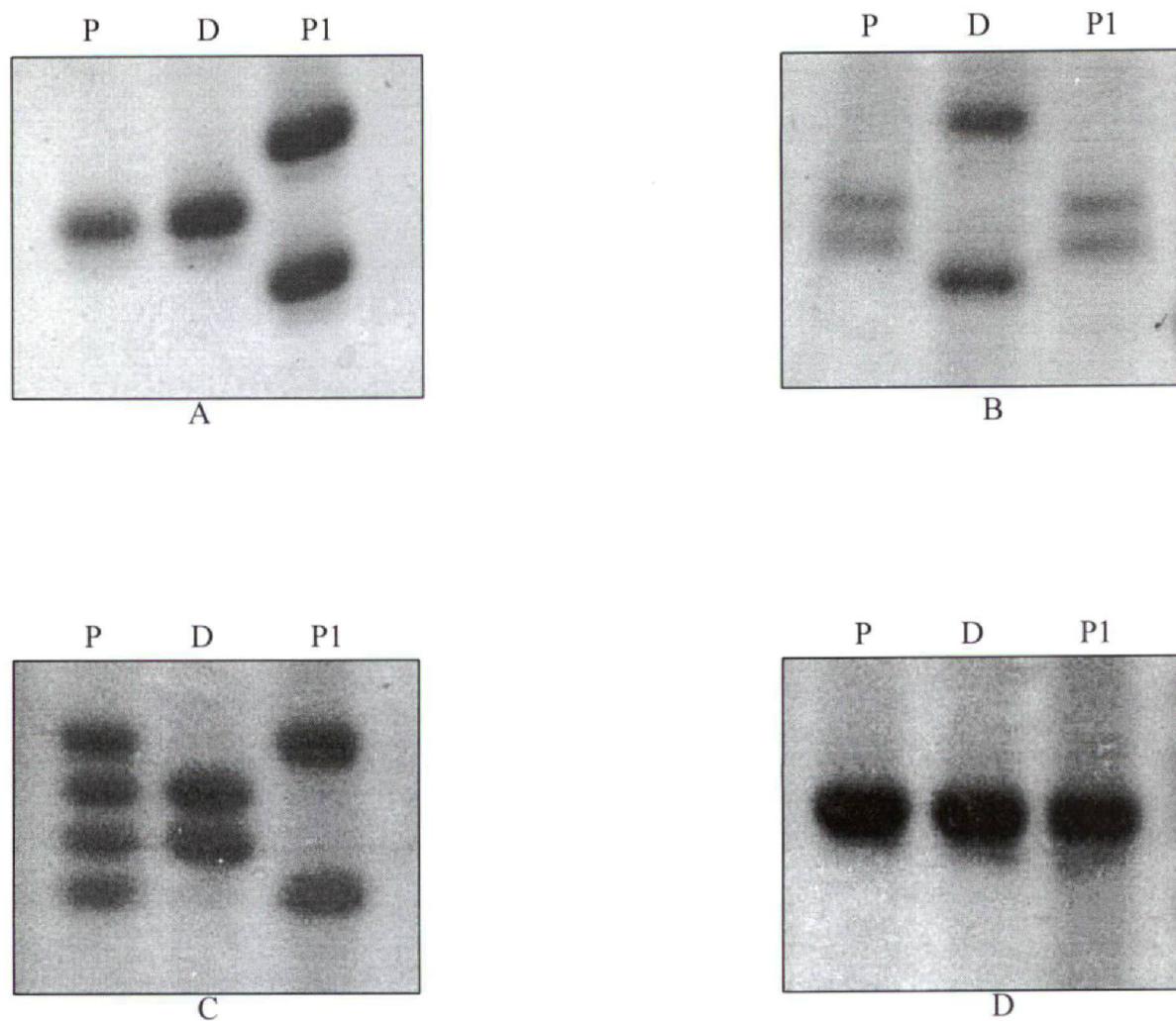


Figura 4: Loco **TPO** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 17), B = recuperação autóloga (par nº 4), C = recuperação quimérica (par nº 36) e D = loco **TPO** não informativo (par nº 7). P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

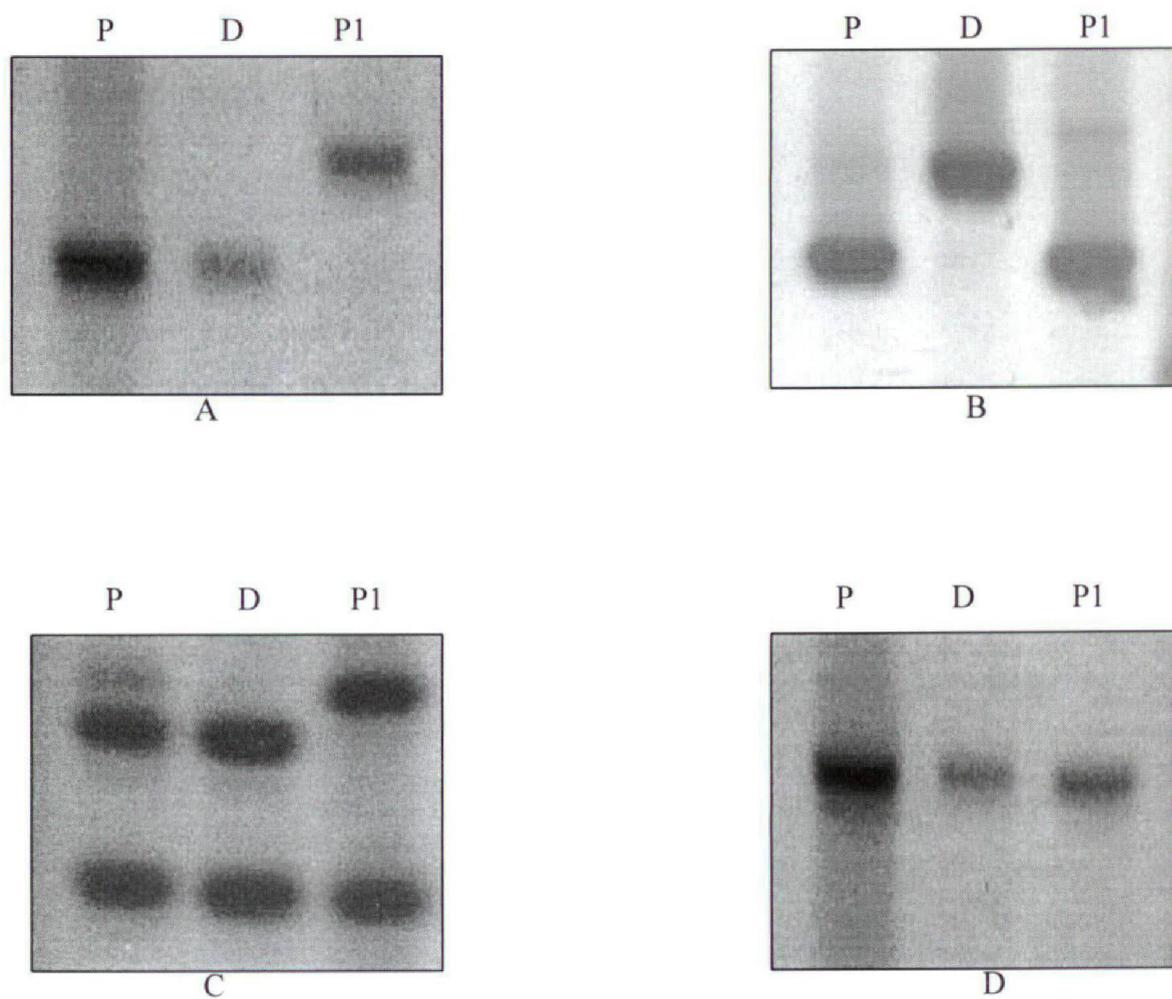


Figura 5: Loco **ARA** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 25), B = recuperação autóloga (par nº 10), C = recuperação quimérica (par nº 12) e D = loco **ARA** não informativo (par nº 1). P = amostra pós- transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

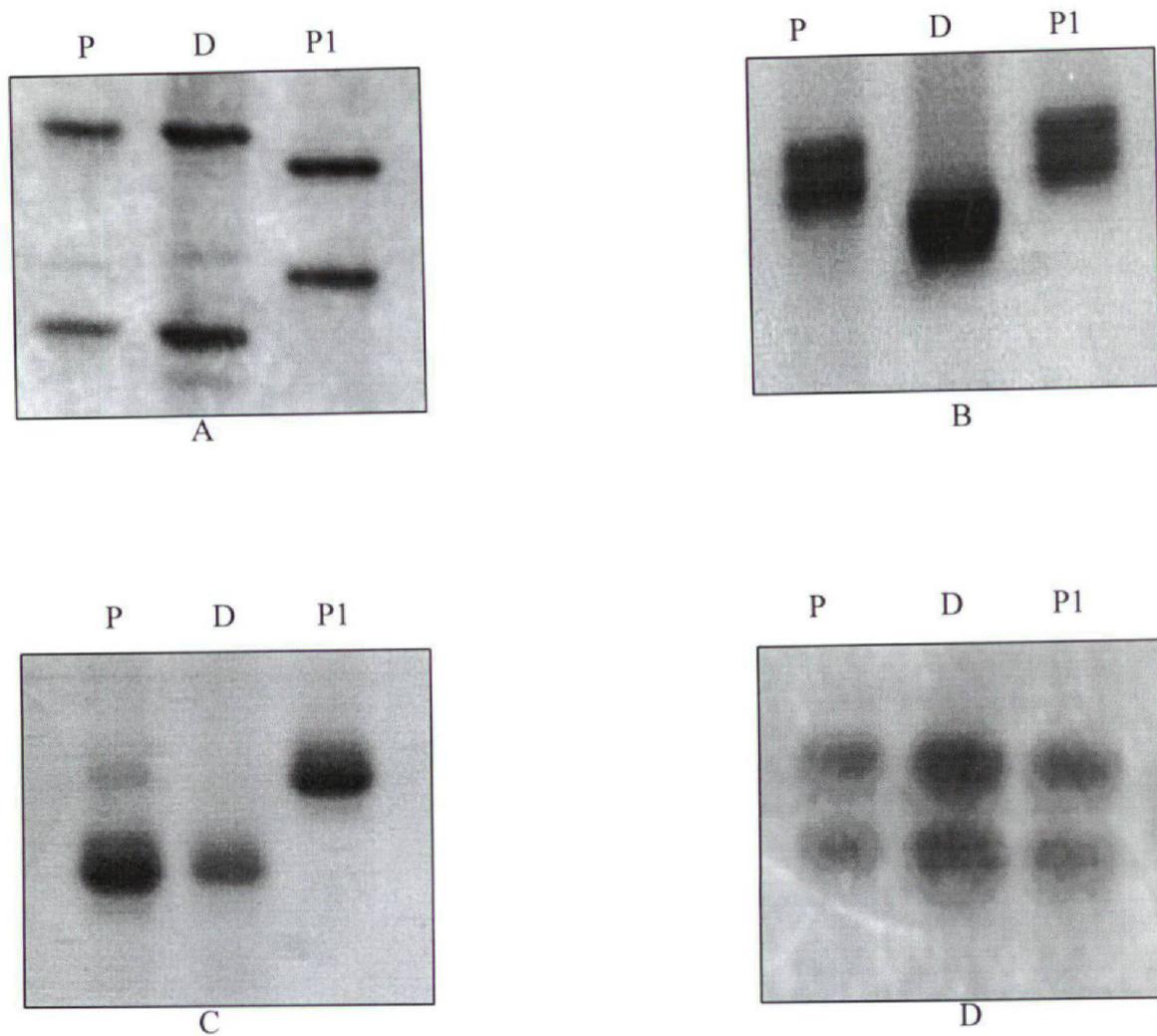


Figura 6: Loco **TH01** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 22), B = recuperação autóloga (par nº 10), C = recuperação quimérica (par nº 12) e D = loco **TH01** não informativo (par nº 8). P = amostra pós- transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

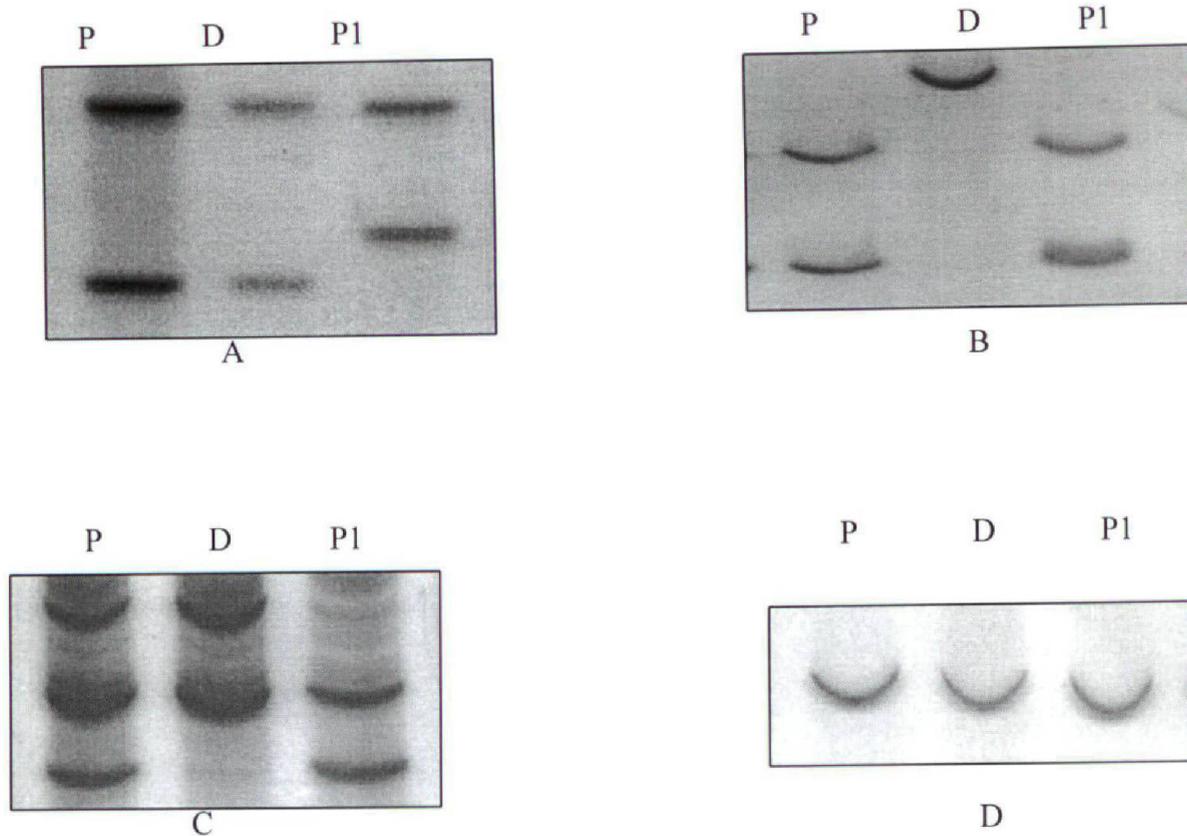
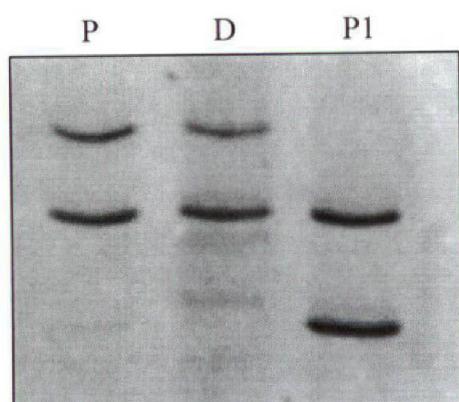
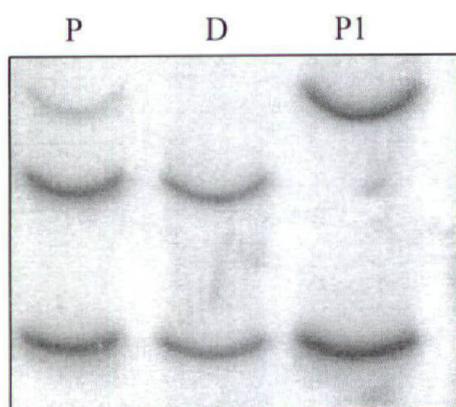


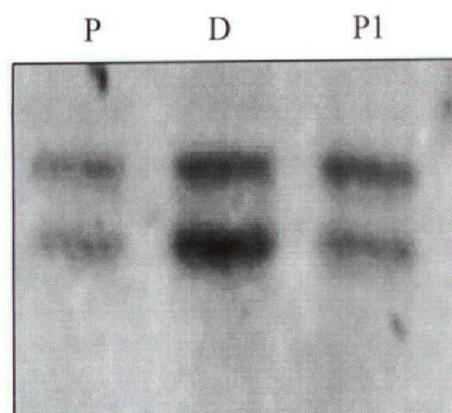
Figura 7: Loco **D1S80** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 24), B = recuperação autóloga (par nº 15), C = recuperação quimérica (par nº 35) e D = loco **D1S80** não informativo (par nº 6). P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.



A



C



D

Figura 8: Loco **33.6** informativo: A = recuperação alogênica (par nº 18), C = recuperação quimérica (par nº 12) e D = loco **33.6** não informativo (par nº 27). P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

\* Este loco não apresentou padrão de recuperação autóloga.

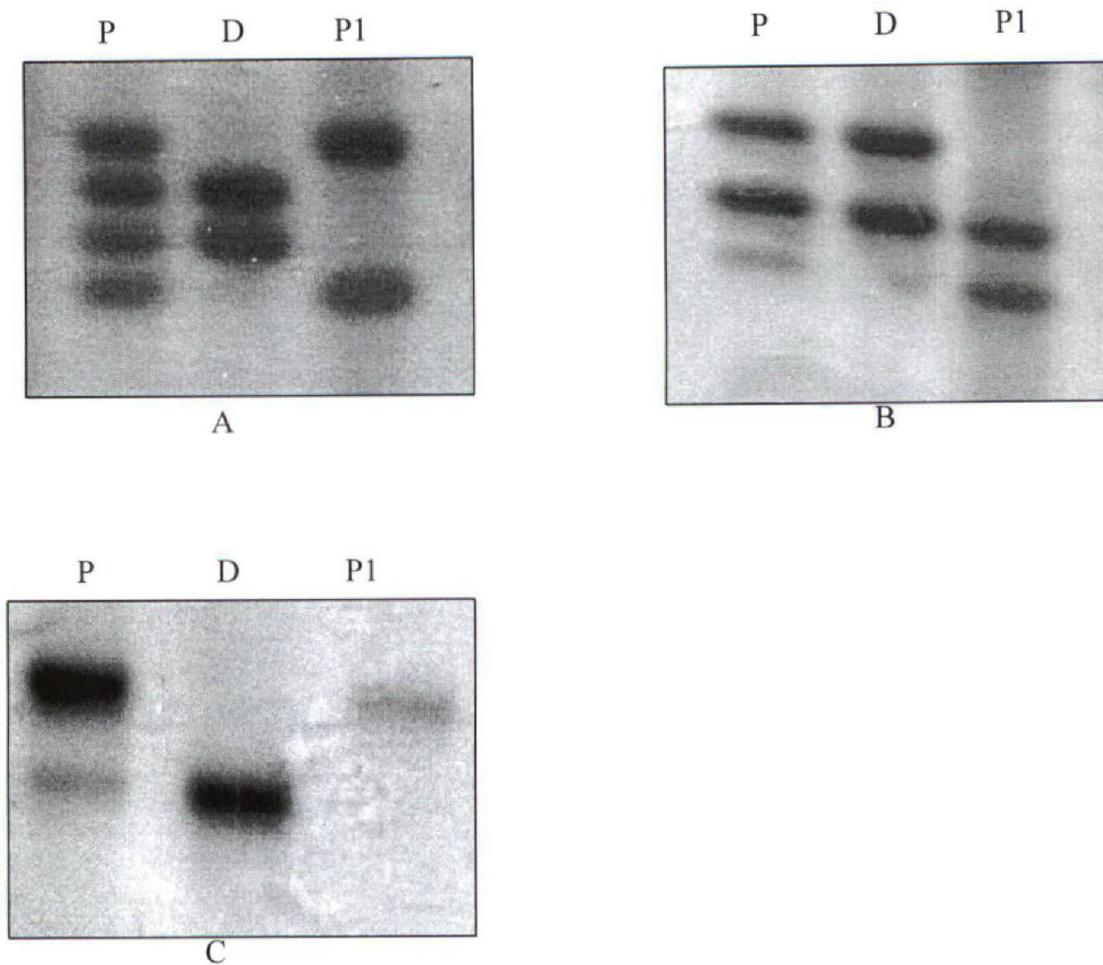


Figura 9: Padrões eletroforéticos com diferentes graus de quimerismo: A = 50 a 55% de células do doador (par nº 35); B = 85 a 90% de células do doador (par nº 11) e C = 5 a 10% de células do doador (par nº 21). P = amostra pós-transplante; D = amostra do doador e P1 = amostra pré-transplante.

#### IV. DISCUSSÃO

Como nos referimos no item 2.1.3 da Introdução, a aplicação terapêutica dos transplantes de medula óssea em pacientes com doenças hematológicas, baseia-se em um procedimento denominado condicionamento que consiste no preparo adequado dos pacientes nos dias que antecedem a infusão. O condicionamento objetiva a erradicação dos clones neoplásicos nos pacientes leucêmicos e promover a imunossupressão necessária aos pacientes com AAS, criando um ambiente apropriado na medula óssea para permitir a proliferação das células-tronco transplantadas e o restabelecimento do funcionamento normal do tecido.

Apesar dos constantes aprimoramentos dos regimes de condicionamento, não raramente se encontra células do receptor após o TMO. No caso de pacientes com AAS, se espera que células do receptor estejam presentes após o transplante devido ao regime de condicionamento ser menos intenso do que para pacientes com desordens malignas (SMITH e MARTIN, 1999). Se estas células forem neoplásicas, freqüentemente, mas não obrigatoriamente, resulta em uma recidiva nos casos de leucemia. Se forem normais, podem atuar rejeitando ou não as células do doador, contribuindo no último caso para o estabelecimento de um quimerismo celular. A ocorrência de quimerismo não significa que necessariamente irá ocorrer a rejeição do

enxerto. O quimerismo pode evoluir tanto para uma recuperação alogênica quanto para uma recuperação autóloga. A presença de células somente do doador é correlacionada com o sucesso do procedimento do TMO e, neste caso, ocorreu recuperação alogênica, enquanto que se a presença de células somente do receptor forem detectadas após o TMO indica que o procedimento não teve sucesso e que houve recuperação autóloga.

Pelo que acima foi descrito, fica evidente a importância clínica e científica da análise das células do doador e do receptor no organismo do último após o TMO. Marcadores genéticos que permitam esta observação podem fornecer informações sobre a repopulação autóloga, a rejeição e o sucesso do transplante. Inicialmente, os marcadores genéticos mais utilizados foram os antígenos eritrocitários e leucocitários, alotipos de imunoglobulinas, enzimas eritrocitárias e leucocitárias e marcadores citogenéticos. A utilização dos antígenos eritrocitários e leucocitários e das enzimas eritrocitárias e leucocitárias, apresenta a desvantagem de poderem ser avaliados somente de quatro a seis meses após o transplante, devido a transfusões sangüíneas pós-transplante e, muitas vezes, é difícil determinar o fenótipo eritrocitário do paciente antes do transplante, se o mesmo recebeu inúmeras transfusões sangüíneas (SCHWARTZ *et al.*, 1995). A análise dos alotipos de imunoglobulinas freqüentemente é não informativa e seu emprego após o TMO é incompatível se o paciente é submetido a transfusões de produtos de plasma (HILL *et al.*, 1986; PETZ *et al.*, 1987).

Quando doador e receptor são de sexos diferentes os cromossomos sexuais são, naturalmente, excelentes marcadores permitindo a análise das células tanto em divisão quanto na interfase. No entanto, em aproximadamente 50 % dos casos de TMO, este estudo não pode ser aplicado pois o doador e o receptor são do mesmo sexo (PETZ *et al.*, 1987). Quando isto acontece, a análise citogenética pode ser realizada pelo estudo das variantes polimórficas, utilizando ou não técnicas de bandeamento, sendo preferível a análise com o emprego destas técnicas. Neste caso, freqüentemente a utilização de variantes polimórficas reveladas pelos bandeamentos Q e C e pelo emprego de enzimas de restrição é de grande auxílio, pois ocorrem em alta freqüência no genoma humano, apresentam alta estabilidade e segregam de acordo com os padrões mendelianos (RIBEIRO, 1993; RIBEIRO *et al.*, 1996). KHOKHAR *et al.* (1987), por exemplo, utilizando o bandeamento Q observaram que 17 dos 20 (85%) pares de doadores/receptores, puderam ser identificados por pelo menos uma variante polimórfica. Também, RIBEIRO (1993) utilizando o bandeamento C identificou, por pelo menos uma variante, as células dos nove pares de doadores/receptores estudados, pela análise dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomos 1, 9 e 16. Os estudos citogenéticos apresentam limitações por não permitirem, nos núcleos interfásicos, a análise de aberrações cromossômicas não estabelecidas anteriormente e, nos casos de células em divisão, porque nem sempre se pode obter pelo método direto, um número de células que possibilite uma informação mais consistente.

Os avanços metodológicos introduzidos na biologia molecular possibilitaram a análise de marcadores genéticos ao nível genômico e tornaram disponível um maior número de sistemas genéticos (LEEUWEN *et al.*, 1991; LECLAIR *et al.*, 1995; SCHWARTZ *et al.*, 1995). O emprego da reação em cadeia da polimerase para a análise de regiões hipervariáveis do genoma humano é, atualmente, indicado para avaliar a repopulação do sistema hematológico de pacientes submetidos ao TMO. A utilização desta metodologia aumentou o poder de discriminação, permitiu a quantificação de uma população de células com frequência igual ou inferior a 5% em uma amostra heterogênea e permitiu a análise do grau de quimerismo após o TMO, antes do 10º dia após este procedimento (MACKINNON *et al.*, 1992; SCHWARTZ *et al.*, 1995; THIEDE *et al.*, 1999).

Neste trabalho, estudamos através da PCR seis locos (**D1S80**, **ACTBP2**, **TH01**, **33.6**, **ARA** e **TPO**) para analisar o tipo de recuperação (autóloga, alogênica ou quimérica) de 37 pacientes com anemia aplástica severa, submetidos ao transplante de medula óssea em um tempo médio de 56,51 ± 47,98 meses entre o transplante e a coleta do material. Dos 222 procedimentos realizados, apenas um (0,45%) não teve sucesso o que propiciou a não obtenção de resultado em apenas um loco (**33.6**) para um dos pares doador/receptor estudado (nº 3). Isto indica o sucesso do procedimento metodológico. Observou-se também que 60,18% dos locos estudados foram

informativos, distribuindo-se de dois a seis, com uma média de  $3,59 \pm 1,12$  de locos informativos nos 37 pares de doadores/receptores.

Verificou-se também que os resultados informativos e não informativos distribuíram-se igualmente pelos seis locos estudados ( $\chi^2_5 = 10,898$ ;  $P > 0,05$ ). Estas informações indicam que a metodologia empregada para o estudo proposto é eficiente e que qualquer um dos seis locos analisados apresenta a mesma probabilidade de obter resultados conclusivos. Estes dados demonstram que a análise por PCR de regiões hipervariáveis do genoma humano é mais eficiente para avaliar o comportamento competitivo das células do doador e do receptor no organismo do último do que a metodologia citogenética, apesar da reconhecida utilidade desta última. Todos os 37 pares de doador/receptor puderam ser analisados com resultados conclusivos. Já, outra autora do nosso grupo, (RIBEIRO, 1993) utilizando análises citogenéticas, não pode incluir no seu estudo nove (37,5%) dos vinte e quatro pacientes com LMC e quinze (41,7%) dos trinta e seis pacientes com AAS, devido às dificuldades metodológicas como ausência de metáfases, baixo índice mitótico e má qualidade das metáfases obtidas. No entanto, a análise citogenética oferece a vantagem de informar sobre o cariótipo das células do receptor, cuja presença de algumas aberrações cromossômicas indica um prognóstico desfavorável (PALKA *et al.*, 1986). Além disso, a análise de regiões hipervariáveis do genoma por PCR apresenta uma maior praticidade do que os procedimentos que utilizam os polimorfismos de tamanho de fragmentos

de restrição do DNA (RIBEIRO, 1993). Nestes casos, são usadas sondas que detectam um único loco polimórfico que sendo de excelente sensibilidade apresentam um inconveniente metodológico, uma vez que pode ser necessária a utilização de um painel de sondas de DNA em diferentes experimentos, para a detecção de uma banda informativa para o doador e o receptor.

Apenas quatro (10,81%) dos 37 pacientes estudados apresentaram recuperação autóloga, com uma sobrevida após o TMO até a coleta do material de 52, 87, 117 e 137 meses, com uma média de  $98,25 \pm 37,05$  meses de sobrevida. Esta média foi a mais alta dos três tipos de recuperação observadas. Avaliando a evolução clínica destes pacientes observa-se que os mesmos constituíram um grupo onde todos apresentaram rejeição (dois no 16º mês, um no 110º mês e outro no 132º mês após o TMO) tendo as mesmas ocorrido, em média, no  $68,50 \pm 61,28$  mês após o TMO. Um deles (25%) apresentou DECH crônica 66 meses após o TMO. Todos foram condicionados com ciclosfosfamida 200mg/kg de peso. Estas informações não foram submetidas a avaliações estatísticas devido ao pequeno número de indivíduos. mesmo tipo de evolução quanto à rejeição e mesmo procedimento no condicionamento.

Dezoito (48,65%) dos 37 pacientes apresentaram recuperação alogênica, com uma sobrevida após o TMO até a coleta do material que variou de oito a 167 meses, com uma média de  $66,39 \pm 50,41$  meses de sobrevida.

Nenhum destes pacientes apresentou rejeição. Dez (55%) apresentaram DECH (quatro crônica limitada, três aguda, dois crônica extensa e um aguda e crônica limitada). Onze destes pacientes foram submetidos a um condicionamento com ciclofosfamida 200 mg/kg de peso e sete com ciclofosfamida 200mg/kg de peso e bussulfan 12 mg/kg de peso.

Quinze (40,54%) dos 37 pacientes apresentaram quimerismo (oito com 80 a 95% de células do doador; quatro com 5 a 20% de células do doador e três com 50 a 55% de células do doador), com uma sobrevida após o TMO até a coleta do material de três a 119 meses, com uma média de  $33,53 \pm 36,76$  meses de sobrevida. Cinco (33%) destes pacientes apresentaram rejeição que ocorreu entre oito e vinte e dois meses após o TMO com uma média de  $16,40 \pm 5,85$  meses e um (6,67%) apresentou DECH aguda no 1º mês após o TMO. Oito destes pacientes foram submetidos a um condicionamento com ciclofosfamida 200 mg/kg de peso e sete com ciclofosfamida 200 mg/kg de peso e bussulfan 12 mg/ kg de peso.

Conforme as informações apresentadas acima e nos Resultados, verificamos que a aplicação do teste exato de Fisher aos dados dos pacientes com recuperação alogênica e quimérica indicam que há associação entre a ocorrência ou não de rejeição e o tipo de recuperação ( $P = 1,26\%$ ) e verificou-se que isto ocorre principalmente devido a ausência de rejeições entre os dezoito pacientes com recuperação alogênica. A ocorrência ou não de DECH, pela aplicação do mesmo teste, demonstrou que também há associação entre

esta variável e o tipo de recuperação ( $P = 3,6\%$ ) e constatou-se que este resultado é devido principalmente à ocorrência de DECH em apenas um (6,67%) dos pacientes que apresentaram recuperação quimérica. Tendo em vista que o teste empregado é unilateral, em geral ele é utilizado considerando a frequência mínima da amostra (PIMENTEL GOMES, 1976). Portanto, o mesmo nos informa também sobre a probabilidade de obter o valor zero de rejeição na recuperação alogênica e o valor um ou zero de DECH na recuperação quimérica.

São poucos e relativamente recentes os trabalhos que avaliam o tipo de recuperação dos pacientes submetidos ao TMO, através da utilização da PCR para análise das regiões hipervariáveis do genoma. No entanto, em todos eles a recuperação alogênica é a mais freqüente, tendo sido observada em 88,89% dos nove pacientes estudados por STUPPIA *et al.* (1995), seguida pela quimérica em 11,11% dos pacientes; em 70,59% dos doze pacientes analisados por CASADO *et al.* (1996), seguida pela quimérica em 29,41% dos pacientes; em 66,67% dos seis pacientes estudados por MARTINELLI *et al.* (1997), seguida pela quimérica em 16,67% e pela autóloga em 16,67% dos pacientes e em 65,45% dos 55 pacientes analisados por BADER *et al.* (1998), seguida pela quimérica em 32,73% e pela autóloga em 1,82% dos pacientes. Portanto, os nossos dados estão de acordo com estas informações já que 48,65% dos pacientes por nós estudados apresentaram recuperação alogênica, 40,54% apresentaram recuperação quimérica e 10,81% tiveram

recuperação autóloga. Os dados de BADER *et al.* (1998) demonstram também que oito (44,44%) dos dezoito pacientes com recuperação quimérica evoluíram para uma recuperação alogênica. Esta informação aliada aos dados apresentados neste trabalho que demonstram que o tipo de recuperação (quimérica até 55% de células do doador:  $\bar{x} = 18,86 \pm 22,37$ ; quimérica com 80 a 95 % de células do doador:  $\bar{x} = 46,37 \pm 43,25$  e alogênica:  $\bar{x} = 66,39 \pm 50,41$ ) depende do tempo após o TMO ( $b = 0,0071 \pm 0,0033$ ;  $t = 2,151$ ;  $P < 0,05$ ), conforme os dados apresentados nos Resultados, são indicativos que pacientes que apresentaram uma recuperação quimérica quando da coleta do material poderão evoluir para uma recuperação alogênica.

Resultados no mesmo sentido foram apresentados por RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996). Estes autores estudando citogeneticamente 10 pacientes com LMC nos 30°, 90°, 180° e 365° dias após o TMO, verificaram que existe uma tendência de diminuição da presença de células do receptor em função do tempo após o TMO, embora a ausência de significância estatística ( $b = 0,019 \pm 0,010$ ;  $t = - 1,9$ ;  $P > 0,05$ ). Entretanto, os mesmos autores estudando citogeneticamente 17 pacientes com AAS em três períodos após o TMO (30°, 90° e 180° dias) verificaram que o decréscimo de células do receptor depende do tempo após o TMO, com significância estatística ( $b = - 0,033 \pm 0,008$ ;  $t = - 4,125$ ,  $P = 0,01$ ).

RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996) descreveram também que a presença de células do receptor em baixas frequências após o TMO não

determina obrigatoriamente um pior prognóstico. Nos 10 pacientes com LMC acima citados observou-se uma frequência média de células do receptor em um ou mais períodos de cerca de 10%. Destes pacientes, dois (20%) foram a óbito, quatro (40%) apresentaram sinais leves de DECH ou infecções e quatro (40%) não apresentaram intercorrências clínicas após o TMO. Outros cinco pacientes com LMC, entretanto, não incluídos nas análises estatísticas acima referidas, apresentaram em um ou mais períodos após o TMO em média cerca de 50% de células do receptor. Destes cinco pacientes, dois (40%) apresentaram rejeição ou recidiva e quatro (80%) foram a óbito. Nos pacientes com AAS, RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996) descreveram resultados semelhantes. Nos 17 pacientes acima referidos, observou-se uma frequência média de células do receptor em um ou mais períodos após o TMO de cerca de 4%. Nestes pacientes não houve rejeições e a frequência de óbitos foi igual a 12% (2/17). Quatro pacientes com AAS, não incluídos nas análises estatísticas acima referidas, apresentaram em um ou mais períodos após o TMO em média cerca de 40% de células do receptor. Dois (50%) deles apresentaram rejeição e um (25%) foi a óbito.

Baseados nestas informações, aplicamos aos nossos dados dos pacientes com quimerismo o teste exato de Fisher para avaliar a relação de independência do grau de quimerismo (até 55% de células do doador e de 80 a 95% de células do doador) e rejeição, DECH e tipo de condicionamento. Em todos os casos, os valores obtidos foram não significantes (rejeição:  $P =$

10,02%; DECH: P = 53,33% e condicionamento: P = 59,52%). Assim, a ocorrência de rejeição e DECH independe do grau de quimerismo, e este independe do tipo de condicionamento. As duas primeiras informações não concordam com as de RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996). No entanto, se considerarmos o grau de quimerismo em três diferentes grupos: 1 – 5 a 20% de células do doador ou 80 a 95% de células do receptor; 2 – 50 a 55% de células do doador ou 45 a 50% de células do receptor e 3 – 80 a 95% de células do doador ou 5 a 20% de células do receptor, verificamos que três (75%) dos quatro pacientes do primeiro grupo rejeitaram, um (33%) dos três pacientes do segundo grupo rejeitou e um (12,5%) dos oito pacientes do terceiro grupo rejeitou. Estes resultados apresentam-se na mesma direção dos de RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996), indicando que quanto maior for a proporção de células do receptor mais intercorrências clínicas são observadas após o TMO. No entanto, estas comparações devem ser avaliadas com cautela, porque a amostra por nós analisada é pequena e os pacientes estudados apresentaram uma sobrevida média de  $33,53 \pm 36,76$  meses entre o TMO e a coleta do material, enquanto que os pacientes avaliados por RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996) foram estudados até o 6º mês após o TMO.

Finalmente, verificamos nos pacientes com recuperação alogênica e quimérica, e nestes últimos nos pacientes com diferentes graus de quimerismo (tabelas 9 e 10), que o tipo de condicionamento, se ciclofosfamida 200 mg/kg de peso ou se ciclofosfamida 200 mg/kg de peso e bussulfan 12 mg/kg de

peso, não interfere no tipo de recuperação, alogênica ou quimérica, ou nos diferentes graus de quimerismo. Estes resultados estão de acordo com os de RIBEIRO (1993) e RIBEIRO *et al.* (1996) que mostraram que uma melhor ou pior evolução clínica do paciente após o TMO está associado, principalmente, com uma menor ou maior frequência de células do receptor, do que de condicionamentos mais ou menos agressivos, incluindo-se no primeiro caso por exemplo, a aplicação de radiação em doses agudas, como foi sugerido por alguns autores (BRANCH *et al.*, 1983; SCHMITZ, GÖDDE-SALZ e LÖEFFLER, 1985; WALKER *et al.*, 1986).

## V. CONCLUSÕES

1. O fato de termos obtido sucesso em 221 (99,55%) dos 222 procedimentos realizados e de que os resultados informativos e não informativos distribuíram-se igualmente nos seis locos analisados ( $\chi^2_5 = 10,898$ ;  $P > 0,05$ ) indica que a metodologia empregada para o estudo proposto é eficiente e que qualquer um dos seis locos analisados apresenta a mesma probabilidade de obter resultados conclusivos.
2. O tipo de recuperação autóloga foi a menos freqüente: 10,81% (4/37). Todos os pacientes com este tipo de recuperação apresentaram rejeição e foram condicionados com CFA 200 mg/kg de peso. Um apresentou DECH. O pequeno número de indivíduos, o mesmo tipo de evolução clínica quanto à rejeição e o mesmo tipo de condicionamento, não possibilitaram que as informações obtidas neste grupo fossem submetidas a avaliações estatísticas.
3. Dezoito (48,65%) dos pacientes estudados apresentaram recuperação alogênica e 15 (40,54%) apresentaram recuperação quimérica. A ocorrência de rejeição e de DECH está associada ao tipo de recuperação (alogênica ou quimérica), conforme os resultados do teste exato de Fisher ( $P = 1,26\%$  e  $3,6\%$ , respectivamente). Estes resultados são devidos à ausência de rejeições entre os dezoito pacientes com recuperação alogênica e a

ocorrência de DECH em apenas um (6,67%) dos 15 pacientes que apresentaram recuperação quimérica.

4. A ocorrência de rejeições e de DECH independe do grau de quimerismo (até 55% de células do doador e 80 a 95% de células do doador) conforme o teste exato de Fisher ( $P = 10,02\%$  e  $P = 53,33\%$ , respectivamente).
5. O tipo de recuperação alogênica ou quimérica e nesta com diferentes graus de quimerismo (até 55% de células do doador e de 80 a 95% de células do doador) independe do tipo de condicionamento (CFA 200 mg/kg de peso ou CFA 200mg/kg de peso + BUS 12 mg/kg de peso), conforme os resultados do teste exato de Fisher ( $P = 46,10\%$  e  $P = 59,52\%$ , respectivamente).
6. O tipo de recuperação alogênica ou quimérica (com até 55% de células do doador e com 80 a 95% de células do doador) depende do tempo entre o TMO e a coleta do material ( $b = 0,0071 \pm 0,0033$ ;  $t = 2,151$ ;  $P < 0,05$ ). Este resultado indica que pacientes que apresentaram uma recuperação quimérica quando da coleta do material poderão evoluir para uma recuperação alogênica.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A K.; LICHTMAN, A H.; POBER, J. S. Immune response to tissue transplants. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p.337-55.
- ALJURF, M.; GYGER, M.; ABRAJHI, A.; SAHOVIC, E.; CHAUDHRI, N.; MUSA, M.; AUOUB, O.; SETH, P.; ASLAM, M.; AL-FIAR, F. *Mycobacterium tuberculosis* infection in allogeneic bone marrow transplantation patients. **Bone Marrow Transplantation**, v.5, p.551-554, 1999.
- ALONSO, C. A. M.; MALAGHINI, M.; PEREIRA, N. F.; RIBEIRO, E. M. S. F.; PASQUINI, R. Avaliação do quimerismo após o transplante de medula óssea (TMO) através da utilização de sistemas "triplex" de marcadores VNTR. **Revista Brasileira de Genética**, v.20, p.219, 1997.
- ANDRESEN, R.; BRUGGER, W.; THOMSEN, C.; REHM, A.; SPECK, B.; LÖHR, W. Defective monocyte-to-macrophage maturation in patients with aplastic anemia. **Blood**, v. 74, p.2150-2156, 1989.
- ANKER, R.; STEINBRUECK, T.; DONIS-KELLER, H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (Htpo) locus. **Human Molecular Genetics**, v. 1, p. 137, 1992.
- ARMOUR, J. A.; JEFFREYS, A. J. Biology and applications of human minisatellite loci. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v. 2, p.850-856, 1992.
- BACIGALUPO, A.; PODESTA, M.; FRASSONI, P.; MINGARI, L.; MORETTA, M.; LINT, M.; MARMONT, A. Generation of CFU-C suppressor T cells in vitro. **Br. J. Haematol.**, v.52, p.421, 1981.
- BADER, P.; BECK, J.; FREY, A.; SCHLEGEL, P. G.; HEBARTH, H.; BENDA, N.; HANDGRETINGER, R.; EINSELE, H.; NIEMEYER, C.; FAUL, C.; KANZ, L.; NIETHAMMER, D.; KLINGEBIEL, T. Serial and quantitative analysis of mixed of relapse after allogeneic BMT. **Bone Marrow Transplantation**, v.21, nº5, p.487-495, 1998.
- BALAZS I.; BAIRD, M.; CLYNE, M.; MEADE, E. Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.182-190, 1989.

- BARRET, A J.; TRELEAVEN, J. Introduction to bone marrow transplantation. **Bone marrow transplantation in practice.** London: Churchill, 1992.
- BARRET, A J.; GORDON, M. Y. **Bone marrow disorders: the biological basis of treatment.** London: Blackwell, 1993.
- BARRET-LEE, P. Patient conditioning. In: **Color atlas and text of bone marrow transplantation.** London: Mosby, 1995. p.155-159.
- BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística.** Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1988.
- BELL G. I.; SELBY, M. J. & RUTTER, W. J.. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, v.295, pp.31-35, 1982.
- BENDER, K. **The HLA system.** Biotest Diagnostics, v.5, 1991.
- BENJAMIN, S. Introduction. In: TRELEAVEN, Jennifer; WIERNIK, Peter. **Color atlas and text of bone marrow transplantation.** London: Mosby, 1995. p.9-17.
- BITENCOURT, M. A; MEDEIROS, C. R.; ZANIS. J. N.; ANDRADE, R. J.; OGASAWARA, V.; FRIEDRICH, M. L.; BONFIM, C.; RIBEIRO, R.; PASQUINI, R. Prednisone and cyclosporine-A as treatment for severe acquired aplastic anemia: analysis of 101 cases from a single institution. **American Society Hematology**, suppl. 37, 1995.
- BITENCOURT, M. A; MEDEIROS, C. R.; ZANIS. J. N.; ANDRADE, R. J.; OGASAWARA, V.; FRIEDRICH, M. L.; BONFIM, C.; PASQUINI, R. Busulfan plus cyclophosphamide in preparation for allogeneic bone marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia and high risk of graft rejection. **American Society Hematology**, suppl. 38, 1996.
- BITENCOURT, M. A. Comunicação pessoal, 1999.
- BOIRON, J. M.; COTTERET, S.; CONY-MAKHOUL, P.; MEREL, P.; MICHEAU, M.; PEREL, Y.; BELLOC, F.; BERNARD, P.; REIFFERS, J. Stable mixed chimerism without relapse after related allogeneic umbilical cord blood transplantation in a child with severe aplastic anemia. **Bone marrow Transplantation**, v.22, nº8, p.819-21, 1998.

- BRANCH, D. R.; GALLAGHER, M. T.; FORMAN, S. J.; WINKLER, K. J.; PETZ, L. D.; BRUME, K. G. Endogenous stem cell repopulation resulting in mixed hematopoietic chimerism following total body irradiation and marrow transplantation for acute leukemia. **Transplantation**, v.34, p.226-228, 1983.
- BRETAGNE, S.; VIDAUD, M.; KUENTZ, M.; CORDONNIER, C.; HENNI, T.; VINCI, G.; GOOSSENS, M.; VERNANT, J. P. Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. **Blood**. v.70, p.1692-1695, 1987.
- BUDOWLE, B.; GIUSTI, A M.; BAECHEL, F. S.; FOURNEY, R. M.; ADAMS, D. E.; PRESLEY, L. A; DEADMAN, H. A; MONSON. K.L.. Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.841-845, 1991a.
- BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, B. R.; GIUSTI, A M.; EISENBERG, A J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48. p.137-144, 1991b.
- BUSS, S. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptide. **Science**, v.235, p.1353, 1987.
- CAMITTA, B.; RAPPEPORT, J. M.; PARKMAN, R.; NATHAN, D.G. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. **Blood**, v. 45, p.355- 363, 1975.
- CAMITTA, B.; THOMAS, E. D.; NATHAN, D. G.; GALE, R. P.; KOPECKY, K. J.; RAPPEPORT, J. M.; SANTOS, G.; GORDON-SMITH, E. C.; STORB, R. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. **Blood**, v.53. p.504-514, 1979.
- CAMITTA, B.; STORB, R.; THOMAS, E. D. Aplastic anemia (first part of two parts). Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.306, p.645, 1982.
- CAMITTA, B.; ASH, J. M. R.; MURRAY, K.; LAWTON, C.; HUNTER, J.; CASPER, J. Bone marrow transplantation for children with severe aplastic anemia: use of donors other than HLA-identical siblings. **Blood**, v. 74, p.1852-1857, 1989.

- CASADO, L. F.; STEEGMANN, J. L.; PICO, M.; REQUENA, M. J.; RAMIREZ, M.; MADERO, L.; VICARIO, J. L.; ALEGRE, A; GOMEZ, C.; FERNANDEZ-RANADA, J. M. Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v.18, n°2, p.405-409, 1996.
- CHAMPLIN, R. Treatment of aplastic anemia: Current role of bone marrow transplantation and immunomodulatory therapy. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. **Progress in bone marrow transplantation**. New York: Alan R. Liss, 1987, p.37-52.
- CHAMPLIN, R.; HO, W.; BAYEVER, E.; WINSTON, D. J.; LENARSKY, C.; FEIG, S. & GALE, R. P. Treatment of aplastic anemia: results with bone marrow transplantation, antithymocyte globulin, a monoclonal anti T-cell antibody. In: YOUNG, N. S.; LEVINE, A. S.; HUMPHRIES, R. K. **Aplastic anemia: stem cell biology and advances in treatment**. New York, Alan R. Liss, 1984, 227-238.
- CHANG, H. K.; MORRISON, S. L. Bone marrow depression associated with cimetidine. **Ann. Intern. Med.**, v.91, p.58, 1979.
- DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C. G.; LECHAT, S.; DUTREIX, M. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. **Biochimie**, v.79, p.577-586, 1997.
- DECORTE, R.; CUPPENS, H.; MARYNEN, P.; CASSIMAN, J. Rapid detection of hypervariable regions by the polymerase chain reaction technique. **DNA and Cell Biology**, v.9, n° 6, p.461-469, 1990.
- DEKA, R.; DECROO, S.; JIN L.; MCGARVEY, S. T.; ROTHMMER, F.; FERREL, R. E.; CHAKRABORTY, R. Population genetic characteristics of the D1S80 locus in seven human populations. **Hum. Genet.**, v.94, p.252-258, 1994.
- EDWARDS, A; CIVITELLO, A; HAMMOND, H. A; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **Am. J. Hum. Genet.**, v.49, p.746-756, 1991.
- EDWARDS, A; HAMMOND, H. A; JIN, L.; CASKEY, C. T. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, v.12, p. 241-253, 1992.

- FALCÃO, R. P. Terapêutica da anemia aplástica. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v. 33, nº 11/12, p.245-248, 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. pp. 220.
- GAIGER, A; MANNHALTER, C.; HINTERBERGER, W.; HAAS, O; MAROSI, C.; KIER, P.; EICHINGER, S.; FUNOVIC, M.; LECHNER, K. Detection of engraftment and mixed chimerism following bone marrow transplantation using PCR amplification of a highly variable region-variable number of tandem repeats (VNTR) in the von Willebrand factor gene. **Hematology**, v.63, p.227-228, 1991.
- GASCON, P.; ZOUMBOS, N. C.; SCALA, G.; DJEU, J. Y.; MOORE, J. G.; YOUNG, N. S. Lymphokine abnormalities in aplastic anemia: implications for the mechanism of action of antithymocyte globulin. **Blood**, v. 65, p.407-413, 1985.
- GOMEZ, J. R.; GARCIA, M. J.; SERRANO, J.; SANCHEZ, J.; FALCON, M.; CASTILLEJO, J. A; NAVARRO, J. A; MARTIN, C.; TORRES, A. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. **Haematologica**, v.82, p.588-591, 1997.
- HILL, R. S.; PETERSEN, F.; STORB, S.; APPELBAUM, F. R.; DONEY, K.; DAHLBERG, S.; RAMBERG, R.; THOMAS, D. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.67, p.811-816, 1986.
- IBMTR: **Internacional Bone Marrow Transplantation Registration – data management workshop**. Sociedade Brasileira de Transplante de medula Óssea, Curitiba, 1997.
- JANDL, J. H. **Blood. Textbook of hematology**. Boston: Little, Brown, 1987. 1177 p.
- JANTUNEN, E.; PÜLONEN, A.; VOLIN, L.; PARHKALI, T.; KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P.; RUUTU, T.; RUUTU, P. Diagnostic aspects of invasive *Aspergillus* infections in allogeneic BMT recipients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 4, p. 867-871, 2000.

- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V. & THEIN, S. L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.
- KHOKHAR, M. T.; LAWER, S. P.; POWLES, R. L.; MILLAR, J. L. Cytogenetics studies using Q-band polymorphisms in patients with AML receiving marrow from like-sex donors. **Hum Genet**, v.76, p.176-180. 1987.
- KORETH, J.; O'LEARY, J.J.; MCGEE, J. O. D. Microsatellites and PCR genomic analysis. **J. Pathol.**, v. 178, p. 239-248, 1996.
- LECLAIR B.; FRÉGEAU C. J.; AYE M. T.; FOURNEY R. M.. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. **Bone Marrow Transplantation**, v.16, p.43-55, 1995.
- LEEUWEN, J. E. M.; VAN TOL, M. J. D.; BODZINGA, B. G.; WIJNEN, J. T.; VAN DE KEUR, M.; JOOSTEN, A. M.; TANKE, H. J.; VOSSEN, J. M.; KHAN, P. M. Detection of mixed chimaerism in flow-sorted cell subpopulations by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 79, p.218-225, 1991.
- LOCATELLI, F.; ZECCA, M.; NESPOLI, L.; SEVERI, F. Bone marrow transplantation in the treatment of severe aplastic anemia. **Pediatric. Med. Chir.**, v.13, p.31-34, 1991.
- MACHIDA, U.; KAMI, M.; KANDA, Y.; TAKEUCHI, K.; AKAHANE, M.; YAMAGUCHI, I.; KAKIUCHI, C.; TAKEDA, N.; TANAKA, Y.; CHIBA, S.; HONDA, H.; HIRAI, H. *Aspergillus tracheobronchitis* after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 24. p. 1145-1149, 1999.
- MACKINNON, S.; BARNETT, L.; BOURHIS, J. H.; BLACK, P.; HELLER, G.; OREILLY, R. J.. Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell-depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. **Blood**, v.80, p.3235-3241, 1992.
- MARTIN, P. Overview of marrow transplantation immunology. In: FORMAN, Stephen J.; BLUME, Karl G.; THOMAS, E. Donnall. **Bone marrow Transplantation**. Boston: Blackwell, 1994, p.16-21.
- MARTINELLI, G.; TRABETTI, E.; FARRABEGOLI, P.; TESTONI, N.; BANDINI, G.; MOTTA, M. R.; VITTONI, A.; TERRAGNA, C.; PIGNATTI, P. F.;

- TURA, S. Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hypervariable DNA regions. **Haematologica**, v.82. nº 2, p.156-160, 1997.
- McGLAVE, P. B.; HAAKE, R.; MILLER, W.; KIN, T.; KERSEY, J.; RAMSAY, N.K.C. Therapy of severe aplastic anemia in young adults and children with allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 70, p.1325-1330, 1987.
- MELETIS, J.; SAMARKOS, M.; MESOGITIS, C.; MELETIS, C.; MOUGIOU, A; TERPOS, E.; TSIMBERIDOU, A; ANDREOPOULOS, A; KONSTANTOPOULOS, K.; LOUKOPOULOS, D. Severe aplastic anemia relapsing during a pregnancy; spontaneous remission following termination. **Haematologica**, v.29, p.147-151, 1998.
- MELO, M. F. **Associação entre HLA-DR2 e anemia aplástica**. Curitiba, 1996. Monografia (Especialização em Imunologia)-Universidade Federal do Paraná.
- MELO, S. F. **A relevância dos antígenos do complexo HLA nos transplantes de medula óssea com doadores não consangüíneos**. Curitiba, 1996. Monografia (Especialização em Imunologia) - Universidade Federal do Paraná.
- MICKELSON, E. M.; HANSEN, J. A. HLA matching in marrow transplantation. In: SULLIVAN, Keith M.; KOPPA, Scott D. **Marrow transplantation reviews**. Charlottesville: Kluge Carden Jennings, 1995. p. 45-50.
- MILLER, S. A; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, p.1215-1218, 1988.
- MINER S. D., IRELAND, P.; MESHKINPOUR, A.; FRANE, M. In increased HLA DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. **Blood**, 84: 923-927, 1994.
- MION, M. I. **Avaliação da nefrotoxicidade da ciclosporina e seus metabólitos em pacientes com anemia aplástica submetidos a transplante de medula óssea**. Curitiba, 1992. 79p. Monografia (Bacharelado em Biologia) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- MION, M. I. **Doença do enxerto contra o hospedeiro associada à transfusão sangüínea**. Curitiba, 1994. 47p. Monografia (Especialização em Imunologia) - Universidade Federal do Paraná.

- MÖLLER, A ; BRINKMANN, B. Different types of structural variation in STRs: Hum FES/FPS, Hum VWA and Hum D21S11. *Int. J. Leg. Med.*, v.106, p.319-323, 1994.
- MÖLLER, A ; BRINKMANN, B. PCR-VNTRs (PCR-Variable Number of Tandem Repeats) in forensic science. *Cellular and Molecular Biology*, v. 41, p. 715-724, 1995.
- NAKAMURA Y.; LEPPERT, M.; OCONNEL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E.; WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, v.235, p.1616-1622, 1987.
- NAKAMURA Y.; CARLSON M.; KRAPCHO K.; KANAMORI M.; WHITE R.. New approach for isolation of VNTR markers. *Am. J. Hum. Genet.*, v.43, p. 854-859, 1988.
- NAKAO, S. HLA-DR2 predicts a favorable response to cyclosporine therapy in patients with bone marrow failure. *Am. J. Haematol.*, v.239, p.239-40, 1992.
- OSGOOD, E. E.; RIDDLE, M. C.; MATHEW, T. J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. *Annals of Internal Medicine*, v.13, p.357-367, 1939.
- OZBEK, U.; VURAL, B.; KALAYOGLU, S.; SOYSAL, T.; BILGEN, H.; YAVUZ, S.; ANAK, S.; SARGIN, D.; GEDIKOGLU, G.; FERHANOGLU, B.; AKOGLU, T.; TANGUM, Y.; OZCELIK, T. Evaluation of chimerism with DNA polymorphisms in bone marrow transplantation. *Turk. J. Pediatr.*, v.39, p.303-311, 1997.
- PALKA, G.; DI BARTOLOMEO, P.; IACONE, A.; DI GIROLAMO, G.; BETTI, S.; CALABRESE, G.; NATALE, D.; STUPPIA, L.; RIEVE, A.; K.; TORLONTANO, G. Cytogenetics and bone marrow transplantation. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.21, p.147-157, 1986.
- PASQUINI, R. **Transplante de medula óssea na anemia aplástica severa - Estudo em 108 pacientes.** Curitiba, 1991. 123p. Tese (Professor titular do Departamento de Clínica Médica) - Universidade Federal do Paraná.
- PASQUINI, R. Severe aplastic anaemia. *Bone Marrow Transplantation*, p.49-54, 1995.

- PEREIRA, N. F.; MELO, M. F.; VIEIRA-MION, A. L. V.; MION, M. I.; BITTENCOURT, M. A.; JAMUR, V. R.; PROBST, P. B. S.; KLEINA, M.; PASQUINI, R. HLA associations in brazilian aplastic anemia patients. **Human Immunology**, v.60, p. 577, 1999.
- PETZ, L. D.; YAM, P.; WALLACE, R. B.; STOCK, R. D.; LANGE, G.; KNOWLTON, R. G.; BROWN, V. A.; DONIS-KELLER, H.; HILL, R.; FORMAN, S. J.; BLUME, K. G. Mixed hematopoietic chimerism bone marrow transplantation for hematologic malignancies. **Blood**, v.70, p.1331-1337, 1987.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1976.
- POLYMEROPOULOS, M. H.; RATH, D. S.; XIAO, H.; MERRIL, C. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-actin (ACTBP2). **Nucleic Acids Res.**, v.20, p. 14-32, 1992.
- RAPPEPORT, J. M.; BUNN, H. F. Bone marrow failure: aplastic anemia and other primary bone marrow disorders. In: ISSELBACHER, R. J. *et al.* **Harrison's principles of internal medicine**. New York: McGraw-Hill, 1994, p.1754-7.
- REISNER, Y. Graft-Versus-Host Disease and graft rejection: Competing factors in bone marrow transplantation. In: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. **Progress in bone marrow transplantation**. New York: Alan R. Liss, 1987, p.175-184.
- RIBEIRO, E. M. S. F. **Estudos citogenéticos em pacientes submetidos a transplante de medula óssea**. Curitiba, 1993. 251p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- RIBEIRO, E. M. S. F.; CAVALLI, I. J.; SCHMID, A. T. L.; CORNÉLIO, D. A.; TOKUTAKE, A. S.; SPERANDIO-ROXO, V. M. M.; RODRIGUEZ, J. M.; PASQUINI, R. Cytogenetics analysis in human bone marrow transplantation. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 89, p.21-26. 1996.
- ROSTEDT, I.; LALU, K.; LUKKA, M.; SAJANTILA, A. Genotyping of five short tandem repeat loci via triplex and duplex PCR. **Forensic Science International**, v. 82, p.217-226, 1996.

- SAIKI, R.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; RELICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.
- SAJANTILA, A ; LUKKA, M. Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrilamide gel electrophoresis. **Int. J. Leg. Med.**, v.105, p.355-359, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed., Nova Iorque: Cold Spring Harbor University Press, 1989.
- SCHMITZ, N.; GÖDDE-SALS, E.; LÖEFFLER, H. Cytogenetics studies on recipients of allogenic bone marrow transplants after fractionated total body irradiation. **Br. J. Haematol.**, v. 60, p.239-240, 1985.
- SCHREZENMEIER, H.; HERTENSTEIN, B.; WAGNER, B.; RAGHAVACHAR, A.;HEIMPEL, H. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by high frequency of aplastic anemia patients with deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. **Exp. Hematol.**, v.23, p.81-87, 1995.
- SCHWARTZ, D. W. M.; GLOCK, B.; JUNGL, E.; MAYR, W. R. Strategy to detect chimerism in allogeneic bone marrow transplant recipients by PCR-amplification fragment length polymorphism analysis of microsatellite polymorphisms. **Vox Sanguinis**, v.68, p.139-143, 1995.
- SMITH, A. G. Comunicação pessoal, 1994.
- SMITH, A. G.; McFARLAND, C. Chimerism analysis procedure. **Clinical immunogenetics laboratories Fred Hutchinson Cancer Research Center**. Seattle, 1994, 30 p.
- SMITH, A. G.; MARTIN, P. J. Analysis of amplified variable number tandem repeat loci for evaluation of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. **Rev Immunogenetic**, 1999.
- SPECK, B.; GRATWOHL, A ; NISSEN, C.; OSTERWALDER, B.; WÜRSCH, A.; TICHELLI, A ; LORI, A ; REULSSER, P.; JEANNET, M.; SIGNER, E. Treatment of severe aplastic anemia. **Exp. Hematol.**, v. 14, p.126-132, 1986.

- STORB, R. Bone marrow transplantation for aplastic anemia. **Bone Marrow Transplantation**, v. 617, p.583-594, 1994.
- STORB, R. Allogeneic marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia. In: SULLIVAN, Keith M.; KOPPA, Scott D. **Marrow transplantation Reviews**. Charlottesville: Kluge Carden Jennings, p. 61-66, 1995a.
- STORB, R. Bone marrow transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n° 5, p.2649-26452, 1995b.
- STORB, R.; PRENTICE, R. L.; SULLIVAN, K. M.; SHULMAN, H. M.; DEEG, H. J.; DONEY, K. C.; BUCKNER, D.; CLIFT, R. A; SANDRES, J. E.; THOMAS, E. D. Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. **Annals of Internal Medicine**, v. 98, p. 461-466, 1983.
- STORB, R.; THOMAS, E. D.; BUCKNER, C. D.; APPELBAUM, F. R.; CLIFT, R. A; DEEG, H. J.; DONEY, K.; HANSEN, J. A; PRENTICE, R. L.; SANDERS, J. E.; STEWART, P.; SULLIVAN, K. M.; WITHERSPOON, R. P. Marrow transplantation for aplastic anemia. **Seminars in Hematology**, v. 21, p. 27-34, 1984.
- STUPPIA, L.; CALABRESE, G.; DI BARTOLOMEO, P.; PEILA, R.; FRANCHI, P. G.; MORIZIO, E.; PALKA, G. Retrospective investigation of hematopoietic chimerism after BMT by PCR amplification of hypervariable DNA regions. **Cancer Genet Cytogenet**, v.85, n°2, p.124-128, 1995.
- SUDA, T.; OMINE, M.; TSUCHIYA, J.; MAEKANA. T. Prognostic aspects of aplastic anemia in pregnancy. Experience in six cases and review of literatures. **Blut**, v.36, p.285, 1978.
- SYVÄNEN, A ; SAJANTILA, A ; LUKKA, M. Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. **Am. J. Hum. Genet.**, v.52, p.46-59. 1993.
- TANAKA, J.; KASAI, M.; IMAMURA, M.; HIGA, T.; KOBAYASHI, S.; HASHINO, S.; SAKURADA, K.; MIYAZAKI, T. Evaluation of mixed chimerism and origin of bone marrow derived fibroblastoid cells after allogeneic bone marrow transplantation. **British Journal of Haematology**, v.86, p.436-438, 1994a.
- TANAKA, J.; KASAI, M.; IMAMURA, M.; HIGA, T.; KOBAYASHI, S.; HASHINO, S.; SAKURADA, K.; MIYAZAKI, T. Evaluation of mixed chimerism by two-step polymerase chain reaction amplification of hypervariable region MCT118

- after allogeneic bone marrow transplantation. **Ann. Hematol.**, v. 68, p. 189-193, 1994b.
- THIEDE, C.; FLOREK, M.; BORNHÄUSER, M.; RITTER, M.; MOHR, O.; BRENDDEL, C.; EHNINGER, G.; NEUBAUER, A. Rapid quantification of mixed chimerism using *multiplex* amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. **Bone Marrow Transplantation**, v. 23, p. 1055-1060, 1999.
- TYLER-SMITH, C.; WILLARD, H. F. Mammalian chromosome structure. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.3, p.390-397, 1993.
- UGOZZOLI, L.; P. YAM; L. D. PETZ; G. B. FERRARA; R. E. CHAMPLIN; S. J. FORMAN; D. KOYAL; R. B. WALLACE. Amplification by polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. **Blood**, v.77, p.1607-1615, 1991.
- WALKER, H.; SINGER, C. R. J.; PATTERSON, J.; GOLDSTONE, A. H.; PRENTICE, H. G. The significance of host haematopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. **Br. J. Haematol.**, v. 62, p.385-391, 1986.
- WEBER, J.. Human DNA polymorphisms based on length variations in simple-sequence tandem repeats. **Genome analysis: genetic and physical mapping**, v.1, Copyright, pp.159-179, 1990.
- WEBER, J.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p.388-396, 1989.
- WHEAT, T. **Microssatellite DNA as a genetic marker**, 1996.
- WINTROBE, M. M. **Clinical hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- WYMAN, A R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, n.11, pp. 6754-6758, 1980.
- ZOUMBOS, N.; DJEU, J.; YOUNG, N. Interferon is the mediator of lectin induced suppression of hematopoiesis. **J Immunol.**, v.133, p.769, 1984.

- ZOUMBOS, N.; GASCON, P.; DJEU, J.; YOUNG, N.  $\gamma$ -interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.82, P.188, 1985.
- YEH, S. P.; HSUEH, E. J.; YU, M. S.; WU, H.; WANG, Y. C. Oral ciprofloxacin as antibacterial prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 24, p. 1207-1211, 1999.
- YOUNG, N. S.; KURTZMAN, G.; LEONARD, E.; MOORE, J.; OZAWA, K.; PLATANIAS, L.; RAEFSKY, E. Problems in the Pathogenesis of Aplastic Anemia. In:UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. **Progress in Bone Marrow Transplantation**. New York: Alan R. Liss, 1987, p.3-12.
- YOUNG, N. S.; ALTER, B.P.. **Aplastic Anemia Acquired and Inherited**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. 616 p.
- YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, M. D. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. **The New England Journal of Medicine**, v.19, p.1365-1372, 1997.