UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise de STRs e quantificação de quimerismo misto no pós-transplante de células tronco hematopoiéticas: uma ferramenta diagnóstica que permite uma conduta clínica antecipada

Jóice Merzoni

Porto Alegre, novembro de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise de STRs e quantificação de quimerismo misto no pós-transplante de células tronco hematopoiéticas: uma ferramenta diagnóstica que permite uma conduta clínica antecipada

Jóice Merzoni

Trabalho de Conclusão da
Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Simone Martins de Castro
Co-Orientadora: Profa. Dra. Sandrine Comparsi Wagner

Porto Alegre, novembro de 2010.

Este relato de caso foi elaborado seguindo as normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia apresentadas no anexo1.

Título:

Análise de STRs e quantificação de quimerismo misto no pós-transplante de células tronco hematopoiéticas: uma ferramenta diagnóstica que permite uma conduta clínica antecipada

Analysis of short tandem repeats (STR) and quantification of mixed chimerism on post hematopoietic stem cell transplantation: a diagnostic tool for early clinical decisions

Palavras-chave: *Short tandem repeats*, quimerismo, síndrome mielodisplásica, transplante de células tronco hematopoiéticas

Autores:
Jóice Merzoni, graduanda em Farmácia [1]
Sandrine Comparsi Wagner, Doutora em Genética e Biologia Molecular[2]
Simone Martins de Castro, Doutora em Bioquímica [1]

1- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2- Universidade Feevale

Endereço para correspondência:
Jóice Merzoni
Av Independência, 986/802
Bairro Independência
Porto Alegre - RS – Brasil
CEP: 90035-072
joice.merzoni@gmail.com

Resumo

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é a opção terapêutica curativa para pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD); porém é um procedimento que requer um longo e extenso acompanhamento pós-transplante. M.K.G., sexo feminino, 53 anos, com diagnóstico de SMD - IPSS intermediário 2, foi submetida ao TCTH alogênico relacionado em 07/2006. Após 3 meses da realização do TCTH, foi realizada uma análise comparativa de STRs do doador e da receptora e o resultado foi de quimerismo completo, indicando uma completa reconstituição medular. Três anos e dez meses após o TCTH a receptora apresentou bicitopenia no hemograma. Realizou-se uma nova análise de STRs e constatou-se quimerismo misto (52,62%), indicando a recaída da doença. Com base neste resultado, foi programada uma infusão de linfócitos do doador (DLI) com o objetivo de fazer uma GVL (*graft versus leukemia*). Esta DLI induziu quimerismo completo. A paciente foi monitorada através de sucessivas análises de STRs (5 no total) e em 07/2010 verificou-se quimerismo misto (64,25%). Baseado nestes resultados realizou-se uma nova DLI, a qual não foi capaz de erradicar a doença. Embora as DLIs não tenham resultado em respostas duráveis, estas foram capazes de induzir remissão completa, com baixo risco de mortalidade associado, em períodos críticos no pós transplante. Atualmente a paciente encontra-se clinicamente estável e está sendo avaliada para novas decisões terapêuticas. Através deste relato concluímos que a detecção precoce do quimerismo misto quantitativo é uma importante ferramenta diagnóstica para conduzir intervenções terapêuticas no pós-transplante. A avaliação temporal do estado quimera no pós-transplante permite realizar intervenções clínicas precoces que podem ser decisivas para o sucesso do tratamento.

Palavras-Chave: *Short tandem repeats*, quimerismo, síndrome mielodisplásica, transplante de células tronco hematopoiéticas

Abstract

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the curative option for patients with myelodysplastic syndrome (MDS); however it is a procedure that requires a long post-transplantation follow-up. M.K.G., female, 53 years old, with diagnosis of MDS – IPSS intermediate 2, underwent related allogeneic HSCT in 07/2006. Three months after transplantation a short tandem repeats (STR) comparative analysis between donor and recipient result in full chimerism. This result indicates a complete healthy medullar reconstitution. Three years and ten months after HSCT, patient showed bicytopenia on hemogram. A new STR analysis was carried out and showed mixed chimerism (52,62%), indicating relapsed disease. Based on this last result, a donor lymphocyte infusion (DLI) was administered. The purpose of DLI is inducing a graft-versus-leukemia effect and, in fact, this DLI induced full chimerism. Successive analyses of STRs were done on follow-up post-transplantation (five at all) and in 07/2010 a STR analysis showed a new mixed chimerism (64,25%). Based on these results, a new DLI was done; but this one couldn't eradicate the disease. Although all DLIs didn't result in durable responses, they were able to induce complete remission in critical periods and with low-risk of mortality associated. At present, the patient is clinically stable and new therapeutic decisions will be evaluated. We conclude that early detection of quantitative mixed chimerism is an important diagnostic tool that guides therapeutic decisions on post transplantation and these decisions could be decisive for a successful transplantation.

Key words: Short tandem repeats, chimerism, myelodysplastic-myeloproliferative diseases, hematopoietic stem cell transplantation.

Introdução

O transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é um método eficaz de tratamento utilizado em pacientes com doenças imunológicas e hematológicas, incluindo a síndrome mielodisplásica (SMD). Aproximadamente 30-40% dos pacientes com SMD podem ser curados com o TCTH alogênico, porém, a recaída da doença ainda é uma das principais causas de falha desta opção terapêutica (1).

O sucesso do TCTH é dependente de vários fatores, incluindo os regimes de condicionamento e seguimento adotados, além das condições e individualidades inerentes à doença. Dentre as individualidades da doença temos a classificação do tipo de doença, o tempo de diagnóstico, o tratamento prévio recebido, bem como a fase da doença em que o paciente se encontra. As variáveis de condicionamento incluem os esquemas quimioterápicos e/ou radioterápicos empregados no período pré-transplante; e as de seguimento incluem o tipo de doador (relacionado ou não), a profilaxia utilizada, a presença de complicações infecciosas, a ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e da doença do enxerto contra leucemia (*graft versus leukemia* - GVL) (2).

No TCTH as células do doador repovoam a medula óssea produzindo novas células sanguíneas que serão responsáveis pela reconstituição hematopoiética e imunológica do receptor. Consequentemente, o TCTH resulta no restabelecimento da hematopoiese e na gradativa transformação do perfil genético das células hematopoiéticas do receptor para o perfil do doador. Esta gradativa transformação do perfil genético é denominada quimerismo, onde podem co-existir células hematopoiéticas do doador e do receptor. Este fenômeno pode ser observado no sangue periférico e também na medula óssea de pacientes submetidos ao TCTH (3).

Um dos métodos utilizados para verificar o quimerismo é o estudo dos s*hort tandem repeats* (STR). STRs ou microssatélites são sequências repetidas de 3 a 7 pares de base que designam alelos diferenciados e nomeados pelo número de cópias de sequências repetidas contidas nas regiões do DNA em estudo. Os STRs demonstram um alto nível de heterozigosidade, grande polimorfismo e são altamente informativos da individualidade humana (4). Mais de 100 STRs já foram reconhecidos, localizados no genoma e novos são continuamente descobertos e investigados (5). A chance de 2 indivíduos serem idênticos para alelos em 5 ou mais STRs é de aproximadamente 2,4 x 10^{-4} no caso de irmãos (4).

O estudo dos STRs é realizado através do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual permite a amplificação seletiva de sequências específicas do DNA. As vantagens da utilização da PCR incluem o pequeno número de células requerido para análise e a alta sensibilidade, detectando 1 célula em 10^6 células (4).

Dentro deste contexto, a aplicação do estudo dos STRs como marcadores do estado quimera no pós TCTH tem sido utilizada com o objetivo de guiar a conduta clínica para alcançar o sucesso no TCTH (4).

Relato do caso

M.K.G, 53 anos, sexo feminino, com diagnóstico de síndrome mielodisplásica IPSS *(International Prognostic Scoring System)* intermediário 2 em 11/2004, apresentando ao diagnóstico cariótipo com deleção dos cromossomos 1 e 6, teve indicação de TCTH alogênico relacionado (irmão HLA idêntico) como opção terapêutica devido ao grande risco de transformação da doença em leucemia mielóide aguda (LMA) de pior prognóstico. Previamente ao TCTH, foram realizadas análises do perfil de 15 locos de STRs (D5S818, FGA, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D7S820 e CSF1PO) e do loco amelogenia (determinante do sexo) em uma amostra de sangue periférico do doador e da receptora com o objetivo de acompanhar a transformação do perfil genético das células hematopoiéticas, sinalizando o restabelecimento da nova hematopoiese e da pega do transplante. A análise dos STRs foi realizada através do uso da PCR multiplex e a detecção dos produtos da PCR foi realizada em sequenciador automático ABI 3100 Avant com o kit Identifiler (Applied Biosystems®) (6, 7) (8, 9).

O condicionamento prévio ao transplante foi realizado com bussulfan e ciclofosfamida e o TCTH foi realizado em 07/2006 com 2,4 x10^6 céls $CD34^+$/kg. A paciente não apresentou doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda. A recuperação medular foi avaliada pelo hemograma e medulograma e ocorreu no D+26. Após 3 meses do TCTH, uma nova análise de STRs foi realizada com uma amostra de sangue periférico coletado com EDTA e esta resultou em quimerismo completo, ou seja, o perfil genético apresentado por esta amostra de sangue foi idêntico ao perfil do doador, indicando a pega completa do enxerto sem evidências moleculares de uma recaída. Esta condição foi chamada de quimerismo completo.

Três anos e dez meses após o TCTH, em 04/2010, a paciente apresentou piora do hemograma com leucopenia e plaquetopenia. Nesta ocasião, uma nova amostra de

sangue foi analisada para os STRs e o resultado encontrado foi de quimerismo misto, ou seja, células do doador e da receptora co-existiam, indicando a volta da doença. A quantificação do quimerismo foi realizada através do uso da área sob a curva dos picos do eletroferograma conforme estudos de Kristt e cols (5-7). Cinco locos informativos de STRs foram utilizados para fins de cálculo e o resultado foi de % quimerismo do doador de 52,62%.

Para inibir a recaída da doença, uma infusão de linfócitos do doador (*donor lymphocytes infusion* – DLI) foi realizada com o objetivo de fazer uma GVL. A paciente recebeu $1x10^7$ céls $CD3^+$/kg e 2 meses após a infusão, em 06/2010, foi identificado quimerismo completo, indicando que a DLI foi eficaz para fazer a GVL.

A paciente continuou em monitoramento através do hemograma e medulograma permanecendo estável e sem sinais clínicos e hematológicos de recaída até 07/2010. Em 07/2010, realizou-se uma nova análise de STRs e a paciente apresentou novamente quimerismo misto, resultando em % quimerismo do doador de 64,25%, com 5 locos informativos para a quantificação do quimerismo. Baseado nestes resultados foi indicado uma nova DLI com o objetivo de fazer precocemente uma GVL para impedir uma recaída de grandes proporções. Após esta DLI, em 09/2010, a paciente apresentou % quimerismo do doador de 51,20%, indicando a persistência de quimerismo misto. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 1.

Discussão

As síndromes mielodisplásicas constituem um grupo heterogêneo de desordens clonais da medula óssea que se caracterizam por uma hematopoiese ineficaz e variável risco para transformação em LMA (10). As opções terapêuticas para a SMD incluem o uso de fatores de crescimento hematopoiético recombinante humano, uso de quimioterapia de alta e baixa dose, imunomodulação, TCTH e ainda o uso de novas terapias, como o uso de inibidores da *farnesyltransferase* (relacionado ao processamento do oncogene *ras*, mutado em 10-40% dos casos de SMD) (1).

O TCTH para SMD é a opção terapêutica curativa; porém possui riscos e limitações (1). Estudos temporais do perfil quimera são essenciais para monitorar a resposta ao TCTH e possibilitar intervenções anteriores a uma recaída. Regimes de condicionamento de baixa intensidade resultam em menor mortalidade e em uma lenta e gradativa transformação do perfil genético do doador para o receptor, resultando em

quimerismo misto que, em alguns casos, pode ser observado ao longo de vários meses. (10).

Um dos parâmetros mais utilizados para o monitoramento no pós TCTH é o uso da proporção de células sanguíneas do doador em relação às células do receptor. Esta condição é estimada e expressa como percentual de quimerismo do doador e quanto mais este valor se aproximar de 100% maior será o número de células do doador presentes na amostra em análise. Após o TCTH espera-se, idealmente, que todas as células sanguíneas analisadas sejam idênticas ao perfil do doador. Quando esta condição é alcançada denomina-se de “quimerismo completo”, ou seja, 100% das células analisadas são iguais ao perfil do doador. Quanto mais este valor se afastar de 100%, maiores são as chances de uma recaída da doença. Isto evidencia a grande importância da quantificação do quimerismo (7).

Uma das técnicas utilizadas para avaliar e quantificar o quimerismo no pós TCTH é a análise dos STRs. Os STRs são basicamente estruturas que se repetem ao longo do genoma; porém a individualidade humana está no número de repetições destas seqüências. Em cada loco analisado cada indivíduo possui 2 alelos: um materno e um paterno. Como a receptora M.K.G teve seu irmão como doador, logo, eles possuem alguns alelos em comum. Por exemplo, na fig 1, para o loco TPOX, tanto o doador quanto a receptora possuem os alelos 8 e 9. Portanto, este loco não será utilizado para fins de cálculo pois, neste caso, este loco não é informativo da individualidade da receptora. Já o loco D18S51, fig1, é informativo, ou seja, este loco é um marcador do perfil da receptora, pois esta possui os alelos 16 e 18 e o doador possui os alelos 13 e 14. Locos informativos são aqueles onde pelo menos um alelo não é compartilhado entre doador e receptor (6).

Locos informativos foram utilizados para fins de cálculo e estes foram realizados através da área sob a curva dos picos revelados no eletroferograma através da fórmula (D1 + D2 / D1 + D2 +R1 +R2) × 100, onde D1 e D2 são áreas sob a curva dos alelos do doador de amostras quimeras e R1 e R2 áreas sob a curva dos alelos da receptora (7). Os locos FGA, TH01, D2S1338, D7S820 e D18S51 foram utilizados para fins de cálculo, pois eram locos informativos. O coeficiente de variação (CV) calculado ficou inferior a 10% (3,54% para amostra 04/2010, 3,22% para amostra 07/2010 e 4,08% para amostra de 09/2010), o que está de acordo com os critérios de aceite conforme Kristt e cols: se % de quimerismo do doador < 70% o CV deve ser ≤ 10%; se % de quimerismo do doador ≥ 70% o CV deve ser ≤ 5%. Para as amostras da receptora M.K.G, o uso do kit comercial

Identifiler e dos 5 locos informativos para fins quantitativos foi adequado e atendeu aos critérios de aceite propostos por Kristt e cols (11).

O estudo dos STRs para avaliação do quimerismo é atualmente o método mais utilizado para monitorização do quimerismo apresentando a sensibilidade deste é de 1-5%(5). A sensibilidade do teste no contexto da avaliação do quimerismo refere-se a percentual do menor componente do quimerismo que pode ser detectado. Kristt e col verificaram acurácia de 88-98%, precisão de 92-100% e uma média de erro de 2% em suas análises de locos individuais quimeras através do uso da quantificação de quimerismo por STRs (7), evidenciando assim que o uso de STRs é uma ferramenta adequada para quantificação do quimerismo no pós TCTH. Uma técnica alternativa que poderia ser utilizada é o PCR em tempo real; porém este ainda não demonstrou uma clara superioridade em relação ao uso da análise de STRs (5). O uso do cariótipo é um bom aliado, porém fornece apenas informações qualitativas (12).

Com o desenvolvimento de técnicas acuradas para a detecção da recaída, o estudo do quimerismo e sua quantificação, através da análise dos STRs, tornou-se um método de diagnóstico precoce. Este método é capaz de fornecer elementos que permitam modificar precocemente a conduta clínica.

Já é bem conhecido que o sucesso do TCTH depende, em parte, do efeito GVL realizado pelos linfócitos T do doador (2). A GVL possui um papel importante na erradicação da doença em pacientes com neoplasias hematológicas tratados com TCTH (13).

A DLI é frequentemente utilizada para potencializar a GVL em pacientes que recaíram após o TCTH e que possuem opções limitadas de tratamento. Esta conduta tem permitido a manutenção do enxerto e a cura de pacientes que realizaram o TCTH como opção terapêutica. Além disso, a DLI tem sido adotada: 1) como um método para facilitar a reconstituição imune após um TCTH; 2) para induzir quimerismo completo; 3) para tratamento da recidiva e 4) para tratamento de desordens linfoproliferativas pós transplante (14). A DLI, muitas vezes, converte quimerismo misto em completo sem causar DECH através de uma potente reação antitumoral, separando assim a DECH da GVL, enquanto maximiza a atividade antitumoral (13).

A DLI tem sido, até então, uma das opções terapêuticas para recidiva pós-TCTH, porém esta possui alguns riscos a serem considerados previamente a infusão. A toxicidade mais comum e significativa atribuída a DLI é a DECH. A incidência geral de DECH aguda, após uma DLI para recaída de doença, é de 20 a 35%, sendo que os

escores III e IV respondem por 40-60% destes casos de DECH (14). É interessante observar que a presença de DECH após o TCTH parece não ser preditiva para o desenvolvimento de DECH após DLI; porém a proximidade da DLI com o TCTH aparentemente aumenta o risco de DECH (14) (15).

A proposta do uso da DLI neste caso foi a de iniciar uma GVL capaz de inibir os clones displásicos que resistiram aos regimes de condicionamento e seguimento sem ocasionar uma DECH. O estudo dos STRs, apresentando a quantificação do quimerismo misto, possibilitou a realização da DLI em momentos decisivos para a manutenção do enxerto. Submeter a paciente a uma DLI baseada apenas no hemograma, medulograma e cariótipo poderia expor desnecessariamente a paciente ao risco de desenvolvimento de DECH. A quantificação do quimerismo misto possibilita a tomada de decisões acertadas: realizar a DLI em momentos adequados e necessários. A realização de uma DLI em pacientes que apresentam resultado de % de quimerismo do doador ≥ 40% está fortemente relacionada à conversão para quimerismo completo. Neste caso, o benefício da DLI seria largamente superior ao risco de uma DECH decorrente da DLI. Já a realização de uma DLI no momento que a paciente apresenta um % de quimerismo do doador de ≤ 20% está fortemente relacionada à perda do enxerto (13). Portanto, a quantificação do quimerismo misto é de extrema importância para a tomada de decisões adequadas, corretas e precoces.

A última DLI realizada não resultou em conversão para quimerismo completo. Isto indica que esta DLI não foi capaz de realizar o efeito antitumoral máximo erradicando a doença. Campregher *et al*. (16) verificaram que pacientes com SMD com IPSS de alto risco, submetidos a DLI como opção terapêutica para recidiva pós TCTH, respondem melhor do que pacientes com SMD com IPSS intermediário. Neste estudo, os autores sugerem que a resposta superior a DLI, observada nos pacientes com SMD com IPSS alto risco, deve-se a alta expressão de antígenos associados ao tumor nas células desses pacientes com SMD de alto risco. Esta alta expressão de antígenos poderia deixar o clone neoplásico mais suscetível ao ataque imunológico realizado pela DLI.

Embora estudos com o uso da DLI em SMD venham aumentando em número ao longo do tempo, poucos foram realizados com uma amostra de pacientes considerável. O uso da DLI em SMD ainda está sendo estudado e, muito provavelmente, a DLI parece induzir remissão de longo tempo apenas em um subgrupo de pacientes com SMD, sendo necessários mais estudos em cenário multicêntrico (16).

Neste relato de caso, as DLI realizadas em uma paciente com SMD com IPSS intermediário parecem não ter resultado em uma resposta durável de remissão completa; porém estas foram capazes de induzir remissão completa com baixo risco de mortalidade associado em momentos em que havia poucas opções terapêuticas disponíveis. Atualmente a paciente encontra-se clinicamente estável, sem uso de transfusões, sem complicações clínicas e está em avaliação para novas decisões terapêuticas. Caso a paciente atinja critérios para um re-transplante, um novo doador aparentado poderá ser considerado; bem como a avaliação para *mismatches* em genes KIR entre doador e receptor.

O estudo dos STRs, através da PCR multiplex, e posterior detecção em sequenciador automático, permitiu intervenções clínicas precoces, contribuindo decisivamente para a terapêutica pós-transplante. A quantificação do quimerismo misto foi de fundamental importância para a tomada de decisão quanto as DLIs. Estes dados permitem concluir que o estudo quantitativo e temporal do perfil quimera em pós-TCTH é uma valiosa ferramenta de diagnóstico e intervenção precoce da recaída em SMD.

Referências bibliográficas

1. Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. Leuk Res. 2003 Feb;27(2):95-120.
2. Alyea EP. Modulating graft-versus-host disease to enhance the graft-versus-leukemia effect. Best Pract Res Clin Haematol. 2008 Jun;21(2):239-50.
3. Pope S, Chapman H, Lambert J. The effect of bone marrow transplants on DNA profiles; a case example. Sci Justice. 2006 Oct-Dec;46(4):231-7.
4. Grubic Z, Stingl K, Cecuk-Jelicic E, Zunec R, Serventi Seiwerth R, Labar B, et al. Evaluation of mixed chimerism in bone marrow transplantation program in Croatia. Transplant Proc. 2005 Mar;37(2):1388-91.
5. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. Bone Marrow Transplant. 2007 Mar;39(5):255-68.
6. Kristt D, Gesundheit B, Stein J, Shapira MY, Or R, Amar A, et al. Quantitative monitoring of multi-donor chimerism: a systematic, validated framework for routine analysis. Bone Marrow Transplant. 2010 Jan;45(1):137-47.
7. Kristt D, Israeli M, Narinski R, Or H, Yaniv I, Stein J, et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. J Biomol Tech. 2005 Dec;16(4):380-91.
8. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing--comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. Leukemia. 2004 Feb;18(2):248-54.
9. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2001;7(9):473-85.
10. Court DS, Butcher A, Wright G, Thacker C, Ballard D, Barnett M, et al. Strategies to improve the estimation of donor chimerism. International Congress Series. 2004;1261:613-5.
11. Kristt D, Klein T. Reliability of quantitative chimerism results: assessment of sample performance using novel parameters. Leukemia. 2006 Jun;20(6):1169-72.
12. Estey E, Schrier S. Treatment and prognosis of the myelodysplastic syndromes. UpToDate; 2010.
13. Dey BR, McAfee S, Colby C, Sackstein R, Saidman S, Tarbell N, et al. Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2003 May;9(5):320-9.
14. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. Best Pract Res Clin Haematol. 2008 Jun;21(2):205-22.

15. Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. Blood. 2002 Sep 1;100(5):1903-9.
16. Campregher PV, Gooley T, Scott BL, Moravec C, Sandmaier B, Martin PJ, et al. Results of donor lymphocyte infusions for relapsed myelodysplastic syndrome after hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2007 Nov;40(10):965-71.

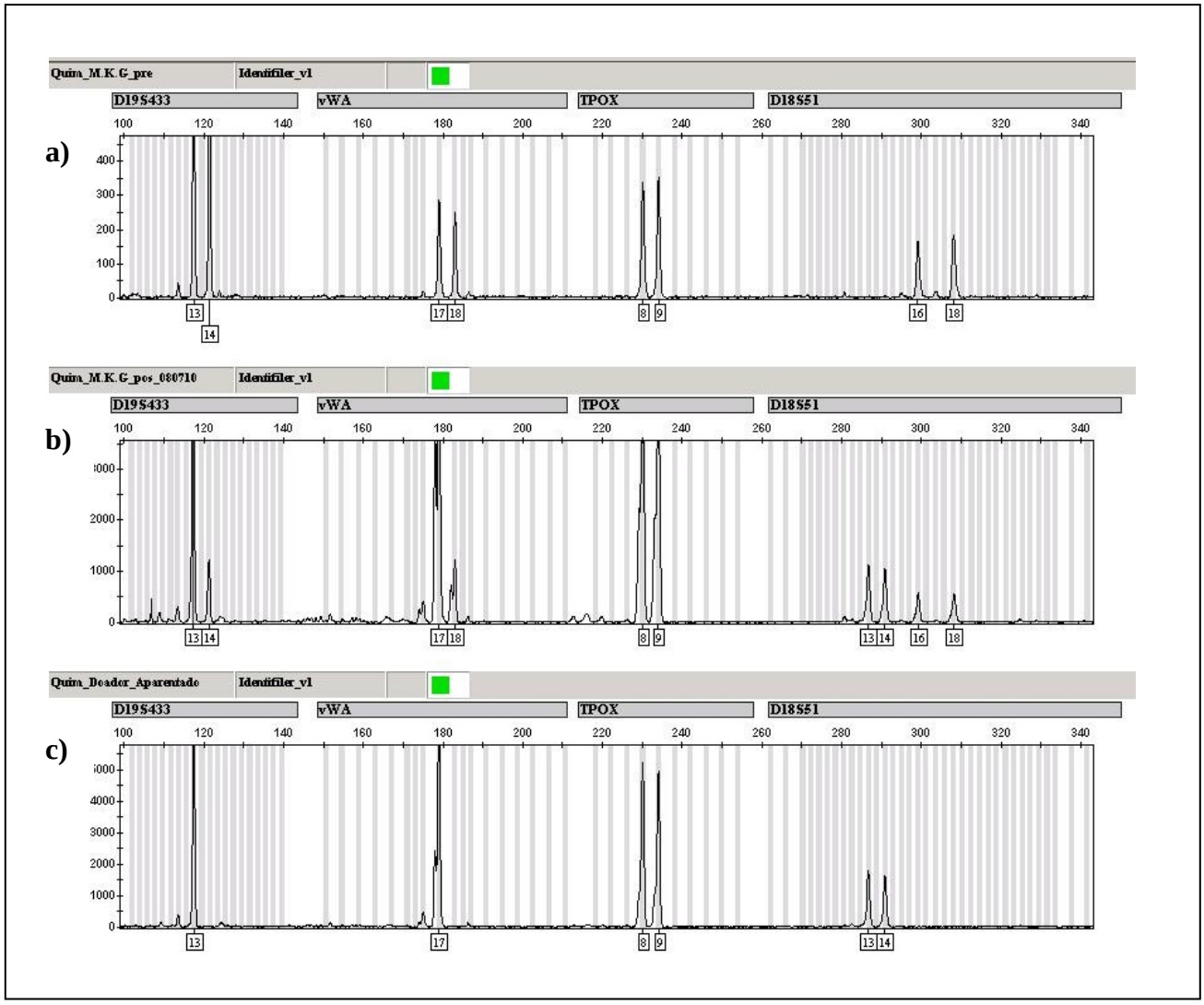

Fig 1: Eletroferograma dos resultados da análise de STRs para os lócus D19S433, vWA, TPOX e D18S51 das seguintes amostras: a) receptora pré-transplante, b) receptora pós transplante em 07/2010 e c) doador aparentado.

Tabela 1: Resultados das análises de STRs nas amostras de sangue periférico da receptora e do doador nas diferentes datas de análise

Loco	*Alelos Receptora Pré TCTH*	*Alelos Doador Aparentado*	*Alelos Receptora pós 10/2006*	*Alelos Receptora pós 04/2010*	*Alelos Receptora pós 06/2010*	*Alelos Receptora pós 07/2010*	*Alelos Receptora pós 09/2010*
Amelo	X, X	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y
D5S818	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13
FGA	19, 24	19, 23	19, 23	19, 23, 24	19, 23	19, 23, 24	19, 23, 24
D19S433	13, 14	13, -	13, -	13, 14	13, -	13, 14	13, 14
vWA	17, 18	17, -	17, -	17, 18	17, -	17, 18	17, 18
TPOX	8, 9	8, 9	8, 9	8, 9	8, 9	8, 9	8, 9
D18S51	16, 18	13, 14	13, 14	13, 14, 16, 18	13, 14	13, 14, 16, 18	13, 14, 16, 18
D3S1358	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16
TH01	8, 9.3	7, 9.3	7, 9.3	7, 8, 9.3	7, 9.3	7, 8, 9.3	7, 8, 9.3
D13S317	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12
D16S539	12, -	12, 13	12, 13	12, 13	12, 13	12, 13	12, 13
D2S1338	20, 23	19, 25	19, 25	19, 20, 23, 25	19, 25	19, 20, 23, 25	19, 20, 23, 25
D8S1179	13, 14	13, -	13, -	13, 14	13, -	13, 14	13, 14
D21S11	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30	28, 30
D7S820	8, 10	8, 9	8, 9	8, 9, 10	8, 9	8, 9, 10	8, 9, 10
CSF1PO	10,11	10, 13	10, 13	10, 13	10, 13	10, 13	10, 13
% de quimerismo do doador	***Não se aplica***	***Não se aplica***	***Quimerismo completo***	***52, 62%***	***Quimerismo completo***	***64,25%***	***51,20%***

Anexo 1: Normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Forma e preparação de manuscritos

O objetivo da **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, ISSN 1516 8484 é promover o desenvolvimento científico da Hematologia e Hemoterapia, publicando artigos originais oriundos de pesquisas, revisões, atualizações, debates, comentários e todo o tipo de contribuição científica das áreas citadas, em português ou inglês. Os manuscritos devem ser publicados de acordo com o Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, Ann Intern Med 1997; 126: 36-47. Todos os manuscritos submetidos à **RBHH** oriundos de ensaios clínicos devem vir acompanhados do respectivo número de identificação do registro em plataforma clínica. www.clinicaltrials.gov

A submissão de manuscritos deve ser obrigatoriamente *on line* sendo imprescindível que:

1) O autor se cadastre e complete o formulário de submissão disponível em: http://www.sgponline.com.br/rbhh;
2) Siga as instruções disponíveis no SGP da **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**;
3) É de responsabilidade dos autores a obtenção de carta de permissão para a reprodução de algum material incluso no manuscrito que porventura tenha sido publicado em outro veículo de comunicação científica;
4) A apresentação do manuscrito deverá conter material original não publicado ou apresentado a outro veículo de comunicação científica.

Critérios gerais: O manuscrito poderá ser escrito em Português ou Inglês. Deve conter: título completo em Português e em Inglês (título resumido: máximo de 50 caracteres), citando a instituição onde o trabalho foi realizado. Os nomes dos autores devem ser completos, por extenso, sem abreviaturas, com identificação da instituição científica e titulação ou cargo de cada um dos autores participantes do manuscrito. Informação sobre qualquer conflito de interesse deve ser relatada. O endereço de autor correspondente designado deve ser completo, com telefone, fax e e-mail para contato. O manuscrito deverá conter resumo em português e abstract em inglês, ambos de até 250 palavras com três a cinco descritores (palavras-chave e key words), que podem ser obtidos junto aos descritores de saúde (Bireme) ou no Medical Subject Headings (MESH) (http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshome.html) da National Library of Medicine dos Estados Unidos.

Referências bibliográficas: Devem ser preferentemente disponíveis: no Medline® ou na PubMed Central®, e na Coleção Scielo Brasil. A **RBHH** usa o estilo de Vancouver: http://www.iemje.org/index.html#reference. As seguintes informações devem ser dadas na citação:1) último sobrenome e iniciais dos 6 primeiros autores (sem pontuação). Havendo mais de 6 autores, colocar *et al* após o sexto nome;2)Título do artigo;3) Nome da revista abreviado;4) Ano da publicação, volume, número e páginas;5) se a referência for um livro, colocar os nomes e iniciais dos editores, da editora e a cidade. Apresentações orais em simpósios ou trabalhos não publicados (comunicações pessoais, trabalhos em preparação) devem ser incluídos no texto e não na lista de referências.

Ilustrações e fotos: Devem ter pelo menos 300 dpi de resolução. Figuras coloridas devem ser em CMYK e serão publicadas em cores somente se for essencial. Devem estar no formato TIFF, JPG ou CDR Não inserir as figuras dentro do texto. Enviar separadamente.

Tabelas: Devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos e citadas no texto em ordem numérica. Se a tabela for excepcionalmente grande ou requeira símbolos especiais, deve ser enviada como uma imagem em um arquivo TIFF ou JPG, em alta resolução.

Todas as pessoas designadas como autores devem ser qualificadas para a autoria. tendo participado efetivamente no trabalho. Autoria inclui contribuição na:(a) Concepção e desenho, análise e interpretação dos dados;(b) Redação do artigo ou sua revisão crítica do conteúdo intelectual;(c) Aprovação da versão final a ser publicada. Mais informações sobre os critérios e créditos de autoria e como ele deve ser baseado, podem ser obtidos no endereço: http://www.iemje.org/index.html#authorship.

Participação na aquisição de recursos financeiros ou compilação dos dados não justifica autoria. Supervisão geral da equipe de pesquisa também não é requisito para autoria. O número de autores segue os preceitos da NLM - NIH - Index Medicus e, dependendo do tipo de contribuição, o número de autores poderá ser estendido, a critério da editoria. A participação dos autores na elaboração do manuscrito deve ser informada.

Relato de caso: No máximo de 1.800 palavras (incluindo as referências). Nº de autores: até 5. Resumo e Abstract: máximo de 250 palavras cada. Tabelas, ilustrações e fotos: Até 2. Referências: até 20. Além dos critérios gerais, deve ter pelo menos uma das seguintes características:

- Ser de especial interesse da comunidade científica; - Um caso raro que é particularmente útil para demonstrar o mecanismo ou a dificuldade no diagnóstico; - Um novo método diagnóstico; - Um novo tratamento ou um tratamento modificado; - Um texto que demonstre achados relevantes, bem documentados e sem ambigüidade; - Texto deve ser dividido em sessões em *Introdução, Relato do caso, Discussão.*