

CONSENSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTE DE
CELULA TRONCO HEMATOPOIETICA (TCTH)

**SELEÇÃO DE DOADOR DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS: HISTOCOMPATIBILIDADE**

Autores: Noemi Farah Pereira, Carmem Vergueiro, Margareth Torres.

Seleção de doador de células-tronco hematopoiéticas: histocompatibilidade

Introdução

A seleção do doador com compatibilidade HLA adequada é essencial para o sucesso do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Doadores HLA genotipicamente idênticos são a primeira escolha, mas apenas cerca de 30% dos pacientes têm esta possibilidade. Doadores não aparentados, sangue de cordão umbilical ou doadores haploidênticos constituem alternativas para os demais 70%. O número de doadores voluntários nos registros mundiais já ultrapassou 30 milhões, o que levou à possibilidade de identificar doadores não aparentados com melhor compatibilidade e aumentou mundialmente o número de transplantes (WMDA: <https://www.wmda.info/>). Nos últimos anos, o cenário do transplante de medula óssea tem sido modificado pela introdução de novas técnicas de depleção células T *in vivo*^{1,2}. A administração da ciclofosfamida (CY) pós-transplante de medula óssea (TMO) está entre as mais utilizadas, e tem impulsionado o transplante com doador haploidêntico como fonte alternativa de células-tronco hematopoiéticas. Considerando todas as alternativas disponíveis, a maioria dos pacientes poderá encontrar um ou mais doadores.

Os genes HLA do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizado no braço curto do cromossomo 6, estão entre os fatores genéticos que exercem maior influência no resultado dos TCTH. Eles são caracterizados por polimorfismo extenso, com mais de 17.000 alelos dos genes de classes I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA-DRB1, -DRB3/DRB4/DRB5, -DQA1/-DQB1, -DPA1/-DPB1) já documentados, e codificam mais de 12.000 proteínas diferentes (www.epi.ac.uk/ipd/imgt/hla). O reconhecimento das moléculas HLA como aloantígenos potentes e o impacto desta alorreatividade na evolução dos transplantes levaram à necessidade de identificar doadores que preferencialmente compartilhem com o receptor os produtos alélicos destes genes³.

A importância da compatibilidade HLA nos TCTH, descrita há algumas décadas, tem sido reavaliada nos últimos anos a partir do desenvolvimento de novas metodologias para identificação das variantes desses genes clássicos de

transplantação. Diversos estudos, após análise retrospectiva dos transplantes com doadores não consanguíneos considerados HLA-A, B e DRB1 idênticos, revelaram incompatibilidades alélicas nestes locos e em outros, não investigados previamente, como HLA-C, DQB1 e DPB1. Os resultados mostram que se deve utilizar preferencialmente doador com compatibilidade alélica nos genes HLA-A, -B, -C e -DRB1, e o impacto das incompatibilidades destes genes sobre as complicações imunológicas pós-TCTH têm sido amplamente demonstrada⁴⁻⁷. O efeito cumulativo ou sinergismo das incompatibilidades HLA constitui fator de risco de falha de pega do enxerto, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e mortalidade tanto em pacientes com doenças neoplásicas de risco padrão como naqueles com doença avançada, embora o efeito aditivo das incompatibilidades HLA seja mais pronunciado em pacientes considerados de baixo risco. A diminuição de aproximadamente 10% na sobrevida pós-transplante a cada incompatibilidade HLA adicional foi demonstrada num estudo do NMDP⁸. Entretanto, nos transplantes haploidênticos não mieloablativos com CY pós-transplante não foi observada vantagem de compatibilidade adicional no haplótipo não compartilhado por descendência pelo receptor e seu doador⁹. Estes efeitos adversos nos transplantes foram também observados na presença de múltiplas incompatibilidades de locos de baixa expressão (HLA-DRB3/B4/B5, -DQB1 e -DPB1)¹⁰. Várias investigações sobre a influência de HLA-DP na evolução pós-TCTH levaram à sua inclusão como antígeno de transplantação¹¹⁻¹⁵. Com respeito ao uso de doador com incompatibilidade, não há consenso sobre o impacto relativo dos locos^{6,16-18}. As diferenças nos resultados destes estudos podem ser devido às características amostrais, havendo variabilidade na composição étnica, tamanho amostral, localização geográfica e proporções distintas de incompatibilidades permissíveis e não permissíveis nas populações investigadas.

Outras descobertas relacionadas à imunogenicidade dos antígenos HLA, incluindo investigações moleculares, ensaios celulares e expressão diferencial de genes e ou de alelos distintos de um mesmo gene, têm contribuído para o conhecimento da permissividade das incompatibilidades^{12,19-26}. A direção da incompatibilidade também se mostrou relevante, sugerindo a seleção preferencial de doador cujo vetor de incompatibilidade seja o do hospedeiro contra o enxerto ao invés de bidirecionais ou do enxerto contra o hospedeiro

(DECH)²⁷. Dentre as novas informações, as que mostraram influir na evolução clínica dos transplantes podem ser incluídas nos critérios de seleção principalmente quando houver opções de doadores com condições similares de compatibilidade HLA e ABO, *status* CMV e idade.

O desafio do laboratório de histocompatibilidade é identificar doadores ou sangue de cordão umbilical com incompatibilidades que tenham o menor potencial de reconhecimento pelo sistema imune, observando os modelos de alorreconhecimento celular e humoral^{3,28,29}.

Além dos aloantígenos do sistema HLA, as estratégias de seleção de doador devem considerar outros fatores que também impactam no resultado clínico, tais como idade, sexo, tipo ABO, *status* CMV, paridade entre outros³⁰. Este capítulo discorre essencialmente sobre os antígenos do sistema HLA, cuja influência nos resultados dos transplantes tem sido demonstrada em vários estudos, e que tem recomendação de inclusão nos algoritmos de busca de doadores aparentados e não aparentados de células-tronco hematopoiéticas.

Metodologia para tipificação HLA

O método para tipificação HLA em média resolução comumente utilizado é a PCR-SSO (*polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide*) que restringe o resultado final a um determinado grupo de alelos, os quais são identificados por um código de letras após os dois primeiros dígitos (exemplo: HLA-B*49:AB). Estes códigos foram desenvolvidos pelo National Marrow Donor Program – NMDP (<https://bioinformatics.bethematchclinical.org/hla-resources/allele-codes/>) para facilitar o relato de resultados, e cada um deles corresponde a um conjunto particular de alelos. Por exemplo, a tipificação de um paciente foi HLA-B*49:AB e a de seu doador B*49:CE, sendo que o código AB inclui os alelos B*49:01 e B*49:02, enquanto o CE inclui B*49:03 e B*49:05. Ao analisar estes resultados observa-se que o paciente pode ter o alelo B*49:01 ou B*49:02 e o doador, o alelo B*49:03 ou B*49:05, isto demonstra que ambos já apresentam uma incompatibilidade de loco B porque não há sobreposição de alelos nesses dois grupos. Esses códigos do NMDP iniciaram com duas letras e, à medida que diferentes combinações alélicas foram surgindo, tornou-se necessário usar códigos de três letras, e atualmente já estão sendo utilizadas

mais de quatro letras. As tipificações de média resolução permitem direcionar a escolha de potenciais doadores aparentados ou não aparentados, pois serão selecionados para prosseguir com a tipificação de alta resolução somente aqueles que compartilham um ou mais alelos com o paciente em média resolução.

Após a identificação de doadores potencialmente compatíveis deve-se prosseguir com tipificação HLA em alta resolução, uma vez que já demonstrado que incompatibilidades alélicas podem ser funcionalmente relevantes. Dentre os métodos mais utilizados estão o sequenciamento direto do DNA baseado em Sanger (SBT = *sequence-based typing*), e mais recentemente métodos de sequenciamento de nova geração (NGS = *next generation sequencing*) cujas estratégias permitem a identificação da fase levando à diminuição significativa de resultados com genótipos ambíguos. As sequências obtidas por estes métodos são coletadas e transferidas para programas de computador, que as compara com as sequências dos alelos HLA oficialmente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde, possibilitando deste modo determinar os alelos presentes em cada amostra analisada.

Recomendações gerais

Os laboratórios que realizam exames de histocompatibilidade para transplantes de células-tronco hematopoiéticas devem:

- Seguir padrões de qualidade determinados pela Associação Brasileira de Histocompatibilidade (ABH) e ou por entidades internacionais como a American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) e a European Federation of Immunogenetics (EFI).
- Participar anualmente de programas de controle de qualidade externos ofertados pela ABH ou outros disponibilizados pela ASHI e a EFI.
- Obter acreditação na área de histocompatibilidade e imunogenética pela ABH ou entidades como ASHI e EFI dentre outras.

- Prestar consultoria, por meio de seus diretores e demais especialistas em histocompatibilidade, às equipes médicas dos centros de TCTH atendidos pelo laboratório sempre que solicitado. A consultoria envolve tipos de exames que devem ser realizados e interpretações de resultados que permitem estimar o risco de complicações imunológicas mediante a escolha de determinados doadores para os pacientes com indicação de TCTH. Estas complicações são decorrentes da variabilidade genética que pode desencadear respostas alogênicas primárias ou anamnéticas, celulares e ou humorais, antes ou após o transplante.

Recomendações técnicas

- **Coleta da amostra:** exames de tipificação HLA por métodos moleculares devem ser realizados preferencialmente com sangue periférico coletado em EDTA (5 a 10 mL).
- Coleta de células da mucosa bucal com auxílio de *swabs* deve ser preferencialmente utilizada em crianças pequenas (≤ 12 meses), incluindo aquelas com diagnóstico de imunodeficiência combinada grave (SCID) para evitar a interferência de possíveis células maternas no sangue periférico destes pacientes.
- Pacientes com leucemia: se houver presença de muitas células imaturas em sangue periférico a tipificação HLA inicial ou a confirmatória devem ser realizadas em DNA isolado de células de mucosa bucal ou outro tecido a fim de evitar resultados homozigotos falsos devido à perda de algum fragmento contendo genes HLA de um dos cromossomos do par homólogo número 6. Na ausência de informações sobre o hemograma quando os resultados de tipificação HLA mostrarem homozigose em um ou mais locos ou ainda a presença de um alelo novo deve-se repetir o exame com DNA isolado de outro tecido.
- Pacientes com Anemia de Fanconi: se a tipificação HLA inicial for realizada com sangue em EDTA a tipificação confirmatória deve ser

realizada em DNA de células de mucosa bucal, pois estes pacientes são propensos à quebra cromossômica.

➤ **Transporte:** Quando a coleta for realizada fora do laboratório, as amostras para tipificação HLA devem ser despachadas em recipiente adequado e à temperatura ambiente.

➤ **Tipificação HLA:** O laboratório clínico deve decidir sobre os métodos moleculares para tipificação HLA de média (SSO Reverso em plataforma Luminex) e alta resolução (Sequenciamento de Sanger ou NGS), e validá-las antes de utilizá-las na rotina clínica. Os resultados da tipificação HLA devem ser expressos de acordo com os termos de tipificação HLA³¹ e com a nomenclatura oficial da Organização Mundial de Saúde³², cujas regras estão disponíveis no site do IPD-IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla). Com respeito aos resultados de tipificação de alta resolução:

- Ambiguidades que incluem alelos pertencentes ao mesmo grupo G ou P não necessitam resolução adicional.

G = alelos do mesmo grupo G compartilham as sequências dos exons 2 e 3 dos genes de classe I ou as sequências do exon 2 dos genes de classe II.

P = alelos do mesmo grupo P codificam as mesmas sequências de aminoácidos nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ das proteínas HLA de classe I, a mesma sequência de aminoácidos do domínio $\beta 1$ das proteínas DR ou dos domínios $\beta 1$ e $\alpha 1$ das proteínas DQ e DP.

- Presença de genótipos alternativos requer resolução adicional quando os mesmos são constituídos de dois alelos comuns, ou de um alelo comum e um alelo não comum/não bem documentado sempre que os reagentes disponíveis permitirem.

- Genótipos alternativos com dois alelos não comuns ou não bem documentados não precisam ser resolvidos.
 - Todos os genótipos alternativos não excluídos pelas estratégias disponíveis no laboratório devem ser informados no laudo.
- **Confirmação da tipificação (CT):** Todos os pacientes referidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e seus respectivos doadores (aparentados, não aparentados e sangue de cordão umbilical) devem obrigatoriamente ter o exame de tipificação HLA confirmado com uma segunda amostra antes da realização do transplante. O objetivo da CT é excluir possíveis erros relacionados à identificação das amostras após a coleta ou erros de laboratório em qualquer das etapas pré-analítica, analítica ou pós-analítica. Esta verificação deve ser feita obrigatoriamente antes do paciente iniciar o condicionamento pré-transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Doador consanguíneo de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea/sangue periférico)

A busca inicial é realizada na família do paciente com objetivo de encontrar um irmão ou outro familiar HLA idêntico. Os genes HLA estão ligados, sendo geralmente transmitidos para a descendência como uma unidade por meio de segregação mendeliana simples. As variantes alélicas destes genes são expressas de forma codominante, o que significa que os indivíduos expressam as proteínas HLA herdadas do pai e da mãe.

Ao conjunto de alelos presentes em cada um dos genes HLA localizados em um dos cromossomos do par homólogo número 6 denomina-se haplótipo. Por convenção, os dois haplótipos paternos são designados *a* e *b*, e os haplótipos maternos *c* e *d*. Os descendentes podem herdar uma dentre as quatro combinações parentais possíveis: *ac*, *ad*, *bc* e *bd*. A probabilidade de encontrar de encontrar um irmão HLA idêntico depende do número de filhos gerados pelo

mesmo casal, se houver um irmão é 25%, dois irmãos 44%, três 58%, 68% para quatro irmãos e 90% para pacientes com oito irmãos. Se dois irmãos tiverem um haplótipo em comum e diferirem quanto ao outro, diz-se que eles são HLA haploidênticos.

Portanto, a análise familiar possibilita a identificação dos quatro haplótipos parentais, o que é importante para assegurar a compatibilidade HLA entre irmãos sem a necessidade de tipificar todos os genes clássicos de transplantação do complexo HLA. Por exemplo, dispensando o loco HLA-C por estar localizado entre HLA-A e B. Além disso, prescinde da tipificação HLA em alta resolução porque se pode inferir identidade alélica por meio dos resultados de média resolução.

Recomendações para seleção de doador irmão HLA idêntico (HLA 10/10)

- Solicitar a tipificação HLA-A, -B e -DRB1 em média resolução do paciente e de seus irmãos. Os pais devem ser tipificados sempre que disponíveis, mesmo que não sejam considerados potenciais doadores pela idade avançada, doenças ou outros motivos, porque podem contribuir para elucidação dos haplótipos HLA segregados aos seus descendentes. A definição dos haplótipos parentais permite inferir, com base na tipificação HLA de média resolução, que o paciente e os irmãos que herdaram os mesmos haplótipos parentais têm identidade alélica.
- Quando os quatro haplótipos HLA parentais não forem identificados, seja pela análise dos pais ou pela segregação na família (paciente e irmãos), deve-se proceder à tipificação de alta resolução do paciente e do doador pré-selecionado, mesmo que idênticos na tipificação de média resolução, a fim de assegurar a identidade alélica nos genes clássicos de transplantação. Nesta situação deve-se complementar a tipificação HLA de alta resolução incluindo os locos HLA-C e -DQB1.

- Tipificação HLA-DPB1 do paciente e do doador deve ser realizada quando o paciente apresentar anticorpos anti-DP a fim de investigar se existem anticorpos específicos contra o doador (DSAs = *donor specific antibodies*).

Recomendações para seleção de doador consanguíneo parcialmente idêntico HLA 9/10

Doador consanguíneo com uma incompatibilidade (HLA 9/10) pode ser uma alternativa na ausência de irmão HLA totalmente compatível. Este tipo de doador pode ser encontrado na irmandade em consequência a um evento de permuta genética (*crossing over*) que resulte em haplótipos recombinantes, ou seja, novas combinações alélicas que diferem das parentais.

- Se necessário utilizar doador HLA 9/10, considerando os locos HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1, estender a tipificação ao loco HLA-DPB1 se o paciente apresentar anticorpos contra os produtos alélicos deste gene com objetivo de investigar se existem anticorpos específicos contra o doador (DSAs).
- Se não for possível confirmar os haplótipos parentais e o evento de recombinação, por análise de segregação na família, as tipificações HLA-A, B, C, DRB1 e DQB1 do doador e do receptor devem ser realizadas em alta resolução.
- Ao avaliar doadores HLA 9/10 selecionar preferencialmente aquele cujo vetor de incompatibilidade seja do hospedeiro contra o enxerto (*host versus graft*) ao invés de bidirecionais ou na via do enxerto contra o hospedeiro (*graft versus host*).

Recomendações para seleção de doador HLA idêntico na busca familiar estendida

- A busca de doador entre outros familiares consanguíneos, que não os pertencentes ao núcleo imediato (pais e irmãos), é recomendada quando há

história de uniões consanguíneas porque na ausência deste tipo de união a probabilidade de encontrar doador HLA 10/10 é muito baixa.

- A busca estendida deve iniciar com tipificação HLA-A e -B em média resolução, e ao encontrar potenciais doadores prosseguir com a tipificação dos genes HLA-C, DRB1 e DQB1 neste mesmo nível de resolução.
- Confirmação da tipificação (CT) pode ser realizada em média resolução quando se comprova por análise de segregação os quatro haplótipos parentais na família do receptor. Porém, quando receptor e doador compartilham um haplótipo por segregação e o outro pelo acaso deve-se realizar a tipificação confirmatória em alta resolução.
- Tipificação HLA-DPB1 do paciente e do doador deve ser realizada se o paciente apresentar anticorpos contra os produtos alélicos deste gene a fim de investigar se existem anticorpos específicos contra o doador (DSA).

Recomendações para seleção de doador consanguíneo HLA haploidêntico

Doadores haploidênticos em geral são os pais quando se trata de pacientes pediátricos. Porém, para pacientes adultos podem ser irmãos ou outros familiares que compartilhem por descendência um haplótipo HLA com o receptor e difiram quanto ao outro.

- Se os pais forem considerados doadores haploidênticos deve-se realizar as tipificações HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 de média resolução no par doador/receptor.
- Se os irmãos ou outros familiares consanguíneos forem avaliados deve-se proceder às tipificações HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 de média resolução no par doador/receptor. Porém, se o haplótipo compartilhado não for confirmado pela análise de segregação na família é obrigatório fazer a tipificação HLA de alta resolução de ambos, o receptor e o doador.

- Proceder à tipificação HLA-DP do paciente e do doador haploidêntico quando o paciente apresentar anticorpos para as moléculas codificadas por este gene a fim de investigar se existem anticorpos específicos contra o doador (DSA).
- Doador haploidêntico apresenta compatibilidade mínima de 5/10 com o paciente, mas pode ocorrer compatibilidade adicional em um ou mais locos do haplótipo HLA não compartilhado. Atualmente não há evidência que demonstre um efeito benéfico desta compatibilidade extra, portanto, os critérios de escolha devem ser baseados na presença ou ausência de anticorpos contra antígenos HLA incompatíveis expressos pelo doador e em outros fatores não HLA.

Doador não consanguíneo de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea/sangue periférico)

O doador não aparentado/não consanguíneo é encontrado por meio de consulta ao Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea – REDOME (www.inca.gov.br). Este registro nacional trabalha em colaboração com o NMDP (EUA), por meio do qual tem acesso às informações de doadores de registros de outros países. Esta participação na rede internacional de doadores possibilita ao REDOME tanto buscar doadores para pacientes brasileiros como fornecer células-tronco hematopoiéticas de doadores brasileiros para pacientes de outros países. O Programa REDOME/REREME é totalmente patrocinado pelo governo, gerenciado pelo INCA e reúne os dados de doadores voluntários de células-tronco hematopoiéticas e dos bancos públicos de cordão umbilical de todo o país, sendo hoje o terceiro maior do mundo com mais de quatro milhões de doadores cadastrados.

A consulta ao REDOME deve ser feita por médico cadastrado no REREME (Registro de Receptores de Medula Óssea). O profissional que desejar se cadastrar para inscrever seus pacientes no REREME deve entrar em contato pelo fone (21) 2505-5657 ou por e-mail rereme@inca.gov.br. O médico, após obter sua senha e *log in*, deve inserir os dados do paciente e atualizá-los a cada

três meses enquanto ele estiver em processo de busca de doador voluntário de células-tronco hematopoiéticas ou unidade de sangue de cordão umbilical.

Recomendações para seleção de doador não consanguíneo de medula óssea/sangue periférico

- De acordo com a política nacional vigente, os doadores voluntários são incluídos no REDOME com tipificação HLA-A, -B e -DRB1 em média resolução. Porém, recomenda-se que a inscrição dos receptores no REREME seja realizada com resultados de tipificação HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 em alta resolução. Estas informações agilizam o processo de busca porque ao serem confrontadas com as tipificações de média ou alta resolução dos doadores cadastrados no REDOME e nos registros internacionais direcionam a escolha daqueles potencialmente compatíveis (códigos de letras que incluem os alelos do paciente).
- Realizar a tipificação HLA-C em média resolução e HLA-DRB1 e -DQB1 em alta resolução nos doadores pré-selecionados que ainda não tenham esta informação no registro – Fase 2 do REDOME.
- Selecionar preferencialmente doadores HLA 8/8 ou HLA10/10 na fase 2 para prosseguir com a fase 3 do REDOME, que consiste na confirmação da tipificação (CT) dos genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1. Realizar a CT obrigatoriamente com uma nova amostra.
- Tipificação HLA-DPB1 do paciente e do doador é recomendada nas seguintes situações: 1) Quando houver dois ou mais doadores HLA 10/10 adequados ao transplante (*status* CMV, idade, ABO, sexo, paridade) para minimizar incompatibilidades ou evitar incompatibilidades DP não permissíveis sempre que possível; 2) Com intuito de investigar se existem anticorpos específicos contra o doador (DSA) se o paciente apresentar anticorpos para moléculas DP.

- Quando não houver doador com compatibilidade alélica 10/10 (HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1), e doadores HLA 9/10 forem considerados, selecionar preferencialmente aquele cujo vetor de incompatibilidade seja do hospedeiro contra o enxerto (*host versus graft*) ao invés de bidirecionais ou na via do enxerto contra o hospedeiro (*graft versus host*).

Pesquisa de anticorpos anti-HLA: caracterização das especificidades

A falha primária de pega do enxerto no transplante alogênico de células tronco-hematopoiéticas é uma complicação associada com resultados desfavoráveis, principalmente por mortalidade relacionada ao transplante devido às infecções ou por recaída da doença primária pela ausência de um enxerto funcional. A falência da enxertia, além de fatores relacionados ao condicionamento e ao tipo de depleção de células T, pode ser mediada por células T e células *natural killer* do hospedeiro e ou por aloanticorpos específicos para antígenos HLA do doador (DSA = *donor specific antibodies*)^{28, 33}.

A produção de anticorpos contra moléculas HLA alogênicas é influenciada por sensibilização prévia (gestação, transfusão e transplantes prévios), pelos tipos de incompatibilidade HLA entre doador e receptor, repertório imunológico e doença primária do receptor. Os DSAs podem ser dirigidos às moléculas HLA alogênicas de classe I (HLA-A, B, -C), expressas em praticamente todas as células nucleadas, e ou de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP) cuja expressão é restrita às células envolvidas na resposta imune.

Evidências que anticorpos pré-formados no soro do receptor contra moléculas HLA incompatíveis do doador aumentam o risco de falha primária de pega do enxerto têm sido demonstradas nas diversas modalidades de transplante com doador HLA parcialmente compatível. Embora os mecanismos exatos pelos quais os DSAs causam a falha de pega do enxerto não sejam totalmente conhecidos, pode-se considerar a participação da citotoxicidade mediada por células dependente de complemento (ADCC) e ou da citotoxicidade dependente de complemento (CDC)³³. A correlação entre a presença de DSAs e a função deficitária do enxerto (*poor graft function*) também sugere que estes

anticorpos possam participar na patogênese desta doença, porém os mecanismos subjacentes ainda precisam ser elucidados³⁴.

As primeiras observações sobre a positividade da prova cruzada por CDC constituir um fator preditivo de falência do enxerto no TCTH foram reportadas em 1989 por Anasetti³⁵ e em 2002 por Ottinger³⁶. Após a disponibilização dos ensaios de fase sólida em plataforma Luminex para uso clínico, vários pesquisadores demonstraram o impacto deletério dos DSAs nos transplantes cuja fonte de células-tronco hematopoiéticas foi doador não aparentado^{37, 38}, doador haploidêntico^{34,39,40} e sangue de cordão umbilical⁴¹⁻⁴⁴. Estes resultados permitem recomendar que na presença de DSA selecione-se outro doador, e na indisponibilidade de tal doador que se proceda à remoção dos anticorpos do receptor, pois a presença de DSAs não constitui uma barreira intransponível para o TCTH.

Os estudos supracitados permitem concluir que os exames de detecção e identificação das especificidades e da força dos anticorpos anti-HLA devem ser incluídos nos algoritmos de seleção de doadores de células-tronco hematopoiéticas HLA parcialmente idênticos.

Métodos

Historicamente, o método para detecção de anticorpos anti-HLA é o de microlinfocitotoxicidade, incluindo estratégias para aumentar a sensibilidade do teste como separação das subpopulações linfocitárias, adição de antiglobulina humana (AGH) e aumento do tempo de incubação. Nas últimas décadas, várias técnicas mais sensíveis foram desenvolvidas para detectá-los e identificá-los, tais como a citometria de fluxo e os ensaios de fase sólida em plataforma Luminex. Estes ensaios fundamentados na reação do soro do paciente com um painel de microesferas de poliestireno conjugadas às moléculas HLA estão disponibilizados nos seguintes formatos: 1) Teste qualitativo de triagem (*mixed*), constituído de um *pool* de microesferas com moléculas HLA agrupadas, que indica presença ou ausência de anticorpos anti-HLA; 2) Teste de identificação da especificidade dos anticorpos anti-HLA constituído de um painel de moléculas HLA isoladas (SAB = *single antigen beads*). O teste SAB possibilitou um

importante avanço na determinação da especificidade dos anticorpos e viabilizou a realização da prova cruzada virtual. O teste C1q, uma variação do teste SAB padrão, foi associado com risco elevado de falha primária de pega do enxerto⁴⁰, porém a predição de risco fornecida por este teste pode ser suprida pelas informações sobre a força de reatividade dos anticorpos no teste SAB padrão desde que o soro seja previamente tratado para sobrepujar o efeito prozona⁴⁵.

Análises complementares ao teste SAB padrão são necessárias em algumas situações para se chegar à caracterização final da especificidade dos anticorpos anti-HLA, sendo as estratégias utilizadas baseadas em decisões conjuntas entre o laboratório de histocompatibilidade e o centro de transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Por um lado, o teste SAB contribuiu com o aumento da especificidade e da sensibilidade na identificação dos anticorpos anti-HLA, mas por outro, introduziu alguns desafios na interpretação dos resultados que são decorrentes de limitações inerentes ao método^{46, 47}. Os resultados positivos do SAB devem ser consistentes com a análise epitópica e ou com testes celulares que permitam afastar a possibilidade de reações falso-positivas. Os dados do SAB quando associados aos resultados das provas cruzadas por CDC e ou por citometria de fluxo possibilitam estimar a força dos DSAs.

Recomendações Técnicas

- **Coleta da Amostra:** o exame de detecção e identificação de anticorpos contra moléculas HLA alogênicas é realizado com o soro do receptor. A amostra de sangue periférico do receptor deve ser coletada em tubo seco ou tubo com gel separador seguida de centrifugação para a separação do soro.
- **Transporte:** sempre que possível separar o soro antes da remessa e transportá-lo preferencialmente à temperatura entre 2° e 8°C (gelo artificial). Se não for possível enviar a mostra de sangue total à temperatura ambiente (evitar temperaturas extremas) ao laboratório onde procederão à separação do soro. A amostra de soro deve ser mantida preferencialmente em freezer à -70°C até o momento de realização do exame.

➤ **Exame “Pesquisa de anticorpos anti-HLA”**

- Cada laboratório clínico deve selecionar os ensaios de fase sólida para a detecção (triagem) e caracterização (SAB = moléculas HLA isoladas) de anticorpos anti-HLA e validá-lo antes de utilizá-lo na rotina clínica. Recomenda-se o uso de alguma modalidade de tratamento do soro do receptor (aquecimento, EDTA ou outros), antes da realização dos ensaios, para evitar a inibição de reatividade dos anticorpos pela presença do complemento (efeito prozona)
 - Recomenda-se a utilização de recursos técnicos complementares para designação precisa da especificidade dos anticorpos sempre que o resultado do teste SAB deixar dúvidas sobre a veracidade das reações positivas ou negativas. Estes recursos podem incluir prova cruzada CDC, prova cruzada por citometria de fluxo, painel de fenótipos HLA, experimentos de adsorção/eluição, C1q e outros. A integração dos resultados do SAB, dos testes complementares e das informações sobre eventos sensibilizantes do paciente é fundamental para maior precisão da estimativa de risco imunológico pós-transplante.
- **Complementação da tipificação HLA:** receptor e doador HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 compatíveis podem ou não ser HLA-DPB1 idênticos. Por esta razão, quando houver anticorpos específicos para produtos alélicos destes genes no receptor torna-se necessário proceder à tipificação dos mesmos no doador. Sugere-se também a tipificação complementar do receptor porque o conhecimento do HLA próprio pode contribuir na interpretação dos resultados do teste SAB.
- **Frequência do teste:** a pesquisa de anticorpos anti-HLA deve ser feita quando o paciente inicia o processo de busca, e reavaliada com seu soro recente após seu doador ter sido selecionado, mesmo na ausência de DSA no teste inicial. Isto se deve ao fato do perfil imunológico do paciente ser dinâmico e poder ser alterado por vários fatores, sendo um dos principais a transfusão de hemocomponentes. Além deste, processos inflamatórios decorrentes de infecções ou lesões teciduais podem induzir a reativação de

células B de memória resultando na produção de DSAs independentemente da re-exposição ao aloantígeno.

- **Dessensibilização:** Quando o paciente for submetido a um protocolo de remoção de anticorpos HLA específicos para seu doador HLA parcialmente compatível (haploidentico, aparentado, não aparentado ou sangue de cordão umbilical), deve-se monitorar a eficácia de cada etapa caracterizando os anticorpos anti-HLA por meio de ensaios de fase sólida com moléculas HLA isoladas em plataforma Luminex. Em determinados casos é necessário monitorar os DSAs após o transplante porque se houver efeito rebote após a infusão do aloenxerto haverá tempo hábil para intervenção terapêutica a fim de evitar a falha de pega do enxerto.

- **Tipificação complementar para HLA-DQA1, DPA1, DRB3/B4/B5 para identificação de DSA.** Sugere-se realizar a tipificação complementar dos genes do par receptor/ doador quando um paciente apresentar os seguintes anticorpos no teste SAB:
 - Específicos para a cadeia alfa codificada pelo gene HLA-DQA1.
 - Específicos para a cadeia alfa codificada pelo gene HLA-DPA1.
 - Específicos para moléculas HLA-DR52, DR53 e DR51 codificadas pelos genes HLA-DRB3, DRB4 e DRB5, respectivamente.

Ressaltamos que a tipificação dos genes supracitados permite o refinamento da estratificação de risco de alorreatividade humoral contra o doador pela identificação de DSAs. Além disso, esta sugestão se aplica aos doadores não aparentados bem como aos aparentados sempre que os quatro haplótipos parentais não tenham sido definidos pela análise familiar.

Pesquisa de quimerismo para monitoração pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas

A evolução dos transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é avaliada pela recuperação hematológica e pela análise de quimerismo, pois estes parâmetros fornecem informações sobre a reconstituição hematopoiética dos pacientes, a qual pode ser autóloga, alogênica ou quimérica^{48,49}.

A monitoração do quimerismo pós-TCTH tem sido avaliada pela análise de marcadores genéticos espalhados pelo genoma humano que apresentam número variável de repetições em tandem⁵⁰⁻⁵⁴. Atualmente os STRs (*short tandem repeats*), constituídos de 2 a 6 nucleotídeos, são os locos polimórficos mais utilizados. A identificação destes marcadores deve ser realizada em amostras de sangue periférico do paciente antes e após o transplante (sangue periférico ou medula óssea), bem como na amostra de sangue periférico do doador para que possa ser determinado o nível de quimerismo nos diferentes tempos pós-transplante. Esta determinação permite a detecção precoce de recaída da doença primária, do nível do enxerto, além de fornecer informações sobre a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e efeito do enxerto contra células leucêmicas.

Portanto, as informações sobre a situação quimérica do paciente associada aos outros critérios clínicos e laboratoriais podem contribuir para que intervenções terapêuticas sejam feitas em tempo hábil a fim de prevenir a rejeição do aloenxerto e promover a função hematopoiética eficaz.

Atualmente o método mais empregado na identificação dos STRs se baseia na amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* com marcação fluorescente, e subsequente separação dos fragmentos amplificados por meio de eletroforese capilar em “Analisadores Genéticos”^{52,55-57}. A pesquisa de quimerismo pode ser realizada em células nucleadas totais, porém a sensibilidade do teste pode ser aumentada ao se analisar subpopulações celulares.

A determinação do quimerismo é uma técnica complexa constituída de muitas etapas, as quais podem introduzir variabilidade durante o procedimento. Isto leva à necessidade de padronização da técnica e da interpretação dos testes utilizados em cada laboratório para minimizar a variabilidade dos resultados finais, tanto intra quanto inter-laboratórios, evitando possível impacto destas diferenças no manuseio clínico dos pacientes^{58,59}.

Recomendações técnicas

- **Coleta:** As amostras devem ser coletadas preferencialmente em EDTA. A determinação do nível de quimerismo pós-transplante requer a identificação dos marcadores STR nas seguintes amostras:
 - **Sangue periférico do paciente antes do transplante** para definir o padrão de suas variantes alélicas nos locos STR;
 - **Sangue periférico do doador** para definir o padrão de suas variantes alélicas nos locos STR;
 - **Sangue periférico ou medula óssea do paciente após o transplante** para definir se os alelos identificados nos locos STR são somente os do paciente ou de ambos pacientes e doador ou apenas do doador.

- **Transporte:** As amostras devem ser armazenadas e transportadas à temperatura ambiente (15° - 25°C), principalmente quando for necessário fazer a análise de subpopulações celulares. A refrigeração pode comprometer a viabilidade celular e conseqüentemente a determinação da pureza das subpopulações por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

- **Tempo entre coleta e entrega das amostras do paciente e do doador no laboratório:** Não deve exceder 24 horas quando destinadas ao teste de quimerismo em subpopulações.

- **Pureza:** Deve ser determinada em todas as frações celulares. Quando houver insuficiência de células para avaliar a pureza deve-se informar esta ocorrência no laudo da pesquisa de quimerismo.

- **Concentração e a pureza do DNA:** Devem ser determinadas para assegurar a otimização das condições de termociclagem permitindo amplificação exponencial dos locos STRs.

- **Exame “Pesquisa de quimerismo pós-TCTH”**

- A estratégia escolhida pelos laboratórios para a avaliação do nível de quimerismo pós-TCTH deve levar em conta a reprodutibilidade e a sensibilidade, seja ela utilizando métodos *in house* ou kits comerciais. O método selecionado deve ser submetido a uma extensa validação com células de referência externas antes de ser utilizado na rotina clínica.
- Controles de qualidade internos e externos para avaliação do desempenho dos testes devem ser realizados em bases regulares.
- Sempre que possível utilizar marcadores completamente informativos nos cálculos sobre a porcentagem de quimerismo.
- Marcadores STR que apresentem picos *stutter* coincidentes com picos recíprocos do paciente ou do doador devem ser excluídos dos cálculos ou normalizados por meio de um algoritmo validado.
- Marcadores STR que apresentem distorção acentuada devido à amplificação preferencial devem ser evitados ou normalizados por um método validado.
- Recomenda-se o uso de três ou mais marcadores STR, sempre que possível, porque possibilita a comparação dos resultados ou o relato de uma média.
- No caso de transplantes com duplo cordão umbilical recomenda-se que a porcentagem de quimerismo seja calculada e relatada separadamente para cada unidade.
- A sensibilidade do método deve ser mencionada no laudo.

REFERÊNCIAS

1. McCurdy SR, Kasamon YL, Kanakry CG, Bolaños-Meade J, Tsai HL, Showel MM, et al. Comparable composite endpoints after HLA-matched and HLA-haploidentical transplantation with post-transplantation cyclophosphamide. *Haematologica*. 2017; 102(2):391-400.
2. Aversa F, Bachar-Lustig E, Or-Geva N, Prezioso L, Bonomini S, Manfra I, et al. Immune tolerance induction by nonmyeloablative haploidentical HSCT combining T-cell depletion and posttransplant cyclophosphamide. *Blood Adv*. 2017; 1(24):2166-75.
3. Rowntree LC, Nguyen TH, Gras S, Kotsimbos TC, Mifsud NA. Deciphering the clinical relevance of allo-human leukocyte antigen cross-reactivity in mediating alloimmunity following transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21:29–39.
4. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*. 2002; 99(11):4200-6.
5. Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004; 104(9):2976-80.
6. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe AL, Confer LD, Eapen M, et al. High-resolution donor- recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007; 110(13):4576-83.
7. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. 2015; 125(7): 1189–97.

8. Horan J, Wang T, Haagenson M, Spellman SR, Dehn J, Eapen M, et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood*. 2012; 20(14):2918-24.
9. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, Kowalski J, Tsai HL, Bolanos-Meade J, et al. Nonmyeloablative HLA-Haploidentical BMT with High-Dose Posttransplantation Cyclophosphamide: Effect of HLA Disparity on Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16(4): 482–9.
10. Fernández-Viña MA, Klein JP, Haagenson M, Spellman SR, Anasetti C, Noreen H, et al. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121(22):4603–10.
11. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, et al. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2001; 112(4):988-94.
12. Zino E, Frumento G, Markt S, Sormani MO, Ficara F, Terlizzi SD, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 103(4):1417-24.
13. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009; 114(7):1437-44.
14. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor

haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2012; 13(4):366–74.

15. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2014; 124(16):2596-606.

16. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood.* 2004; 104(7):1923-30.

17. Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation Component. Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens.* 2007; 69 Suppl 1:31-5.

18. Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M, et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(6):885-92.

19. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B, Yang SY. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med.* 1990; 323(26):1818–22.

20. Ferrara GB, Bacigalupo A, Lamparelli T, Lanino E, Delfino L, Morabito A, et al. Bone marrow transplantation from unrelated donors: the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen class I heavy chain. *Blood.* 2001; 98(10):3150–5.

21. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*. 2007; 110(7): 2235–41.
22. Pidala J, Wang T, Haagenson M, Spellman SR, Askar M, Battiwalla M, et al. Amino acid substitution at peptide-binding pockets of HLA class I molecules increases risk of severe acute GVHD and mortality. *Blood*. 2013; 122(22):3651-8.
23. Fernandez-Viña MA, Wang T, Lee SJ, Haagenson M, Aljurf M, Askar M, et al. Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014; 123(8):1270-8.
24. Petersdorf EW, Gooley TA, Malkki M, Bacigalupo AP, Cesbron A, Du Toit E, et al.; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014; 124(26):3996-4003.
25. Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2015; 373(7):599-609.
26. Crivello P, Heinold A, Rebmann V, Ottinger HD, Horn PA, Beelen DW, Fleischhauer K. Functional distance between recipient and donor HLA-DPB1 determines nonpermissive mismatches in unrelated HCT. *Blood*. 2016; 128(1):120–9.
27. Hurley CK, Woolfrey A, Wang T, Haagenson M, Umejiego J, Aljurf M, et al. The impact of HLA unidirectional mismatches on the outcome of myeloablative hematopoietic stem cell transplantation with unrelated donors. *Blood*. 2013; 121(23): 4800-6.

28. Masouridi-Levrat S, Simonetta F, Chalandon Y. Immunological basis of bone marrow failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2016; 362(7):1-8.
29. Sulima Geerman, Martijn A Nolte. Impact of T cells on hematopoietic stem and progenitor cell function: Good guys or bad guys? *World J Stem Cells.* 2017; 9(2): 37-44.
30. Kollman C, Spellman SR, Zhang MJ, Hassebroek A, Anasetti C, Antin JH, et al. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor transplantation for hematologic malignancy. *Blood.* 2016; 127(2):260-7.
31. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, et al. Definitions of histocompatibility typing terms. *Hum Immunol.* 2011; 72(12):1214-6.
32. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens.* 2010; 75(4): 291-455.
33. Martin PJ, LEVY RB. Immune rejection: the immune biology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (from mice to humans). In: Socié, G, Blazar, BR (Eds). *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Models in Discovery and Translation.* London: Academic Press, 2013. p. 83-122.
34. Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, Zhang XH, Wang Y, Han W, et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: a prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol Oncol.* 2015; 8:84-93.

35. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*. 1989; 320(4):197-204.
36. Ottinger HD, Rebmann V, Pfeiffer KA, Beelen DW, Kremens B, Runde V, et al. Positive serum crossmatch as predictor for graft failure in HLA-mismatched allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2002; 73(8):1280-5.
37. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S, Haagenson M, Klein J, Flesch S, et al. The detection of donor directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood*. 2010; 115(13):2704-8.
38. Ciurea SO, Thall PF, Wang X, Wang SA, Hu Y, Cano P, et al. Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011; 118(22):5957-64.
39. Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giralt S, Shpall EJ, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009; 88(8):1019-24.
40. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, Barnes TH, Kongtim P, Carmazzi Y, et al. Complement-binding donor-specific anti-HLA antibodies and risk of primary graft failure in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21(8):1392-8.
41. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, et al. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. 2010; 116(15):2839-46.

42. Cutler C, Kim HT, Sun L, Sese D, Glotzbecker B, Armand , et al. Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2011; 118(25):6691-7.

43. Ansari M, Uppugunduri CR, Ferrari-Lacraz S, Bittencourt H, Gumy-Pause F, Chalandon Y, et al. The clinical relevance of pre-formed anti-HLA and anti-MICA antibodies after cord blood transplantation in children. *PLoS One*. 2013; 8(8): e72141.

44. Ruggeri A, Rocha V, Masson E, Labopin M, Cunha R, Absi L, et al. Impact of donor-specific anti-HLA antibodies on graft failure and survival after reduced intensity conditioning unrelated cord blood transplantation: a Eurocord, Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI) and Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) analysis. *Haematologica*. 2013; 98(7):1154-60.

45. Wiebe C, Gareau AJ, Pochinco D, Gibson IW, Ho J, Birk PE, et al. Evaluation of C1q Status and Titer of De Novo Donor-Specific Antibodies as Predictors of Allograft Survival. *Am J Transplant*. 2017; 17:703–11.

46. Bettinotti MP, Zachary AA, Leffell MS. Clinically relevant interpretation of solid phase assays for HLA antibody. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21(4):453-8.

47. Sullivan HC, Liwski RS, Bray RA, Gebel HM. The Road to HLA Antibody Evaluation: Do Not Rely on MFI. *Am J Transplant*. 2017; 17(6):1455-61.

48. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giral S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D. 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.

50. Quiroga M, Pereira NF, Bitencourt MA, Bonfim C, Monteiro MGM, Pasquini R. Late chimerical status after bone marrow transplantation in Severe Aplastic Anemia according to two different preparatory regimens. *Rev Bras Hematol Hemoter.* Aceito para publicação em 29/11/2017.

51. Bader P, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* 1996; 16(4A): 1759-63.

52. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35(2): 107-19.

53. Kristt D, Israeli M, Narinski R, Or H, Yaniv I, Stein J, Klein T. Hematopoietic Chimerism Monitoring Based on STRs: Quantitative Platform Performance on Sequential Samples. *J Biomol Tech.* 2005; 16(4): 380-91.

54. Stikvoort A, Sundin M, Uzunel M, Gertow J, Sundberg B, Schaffer M, et al. Long-Term Stable Mixed Chimerism after Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Non-Malignant Disease, Shall We Be Tolerant? *PLoS One.* 2016; 11(5):e0154737.

55. Faraci M, Bagnasco F, Leoni M, Giardino S, Terranova P, Subissi L, et al. Evaluation of Chimerism Dynamics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Non-Malignant Diseases. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017; pii: S1083-8791(17)31833-5.

56. Thiede C, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia*. 2001; 15:303-6.

57. Kristt D, Stein J, Klein T. Frontiers of stem cell transplantation monitoring: capturing graft dynamics through routine longitudinal chimerism analysis. *Isr Med Assoc J*. 2007; 9(3):159-62.

58. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 39(5): 255-68.

59. Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2012; 26(8):1821-8.

60. Clark JR, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter G I, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *Br J Haematol*. 2015; 168: 26–37.