

TESIS DOCTORAL

María del Mar Luis Hidalgo



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

2022



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA (Q̄T)  
Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado 3139 (Medicina)

Impacto de la alorreactividad NK  
en el trasplante haploidéntico de  
progenitores hematopoyéticos  
asociado al uso de ciclofosfamida  
postrasplante

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
María del Mar Luis Hidalgo  
Licenciada en Medicina

Dirigida por:  
Prof. Dr. Carlos Solano Vercet  
Dra. Dolores Planelles Silvestre  
Dr. José Luis Piñana Sánchez

Valencia, julio de 2022







VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

**Programa de Doctorado 3139 (Medicina)**

Impacto de la alorreactividad NK  
en el trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos  
asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante.

## **TESIS DOCTORAL**

Presentada por: <b>María del Mar Luis Hidalgo</b>	Dirigida por: <b>Prof. Dr. Carlos Solano Vercet</b>
Titulación: <b>Licenciada en Medicina</b>	<b>Dra. Dolores Planelles Silvestre</b>
	<b>Dr. José Luis Piñana Sánchez</b>

Valencia, julio de 2022





# VNIVERSITAT<sup>Q</sup> VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Medicina  
Programa de doctorado: 3139 Medicina

Impacto de la alorreactividad NK en el trasplante haploideéntico de progenitores  
hematopoyéticos asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante.

Tesis Doctoral presentada por:

**María del Mar Luis Hidalgo**

Titulación:

**Licenciada en Medicina**

Dirigida por:

**Prof. Dr. Carlos Solano Vercet**

**Dra. Dolores Planelles Silvestre**

**Dr. José Luis Piñana Sánchez**

Valencia, julio de 2022



**D. CARLOS SOLANO VERCET**, Doctor en Medicina, Catedrático de Medicina, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**D<sup>a</sup>. DOLORES PLANELLES SILVESTRE**, Doctora en Biología, Facultativo Especialista Adjunto del laboratorio de Histocompatibilidad del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

**D. JOSÉ LUIS PIÑANA SÁNCHEZ**, Doctor en Medicina, Facultativo Especialista Adjunto del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que la licenciada en Medicina **MARÍA DEL MAR LUIS HIDALGO** ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia, el trabajo titulado: "IMPACTO DE LA ALORREACTIVIDAD NK EN EL TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS ASOCIADO AL USO DE CICLOFOSFAMIDA POSTRASPLANTE."

Y para que conste firmamos la presente memoria para optar al grado de Doctora en Medicina en Valencia, 14 de julio de 2022.

**CARLOS  
MARIA  
SOLANO  
VERCET**  
Firmado digitalmente por CARLOS MARIA|SOLANO|VERCET  
Fecha: 2022.07.14 16:47:12 +02'00'

Firmado por MARIA DOLORES PLANELLES SILVESTRE - NIF:\*\*\*3630\*\* el día 14/07/2022 con un certificado emitido por ACCVCA-120

**JOSE LUIS  
PIÑANA  
SANCHEZ**  
NIF:20429338W  
Firmado digitalmente por JOSE LUIS PIÑANA SANCHEZ - NIF:20429338W  
Nombre de reconocimiento (DN): cn=JOSE LUIS PIÑANA SANCHEZ - NIF:20429338W, serialNumber=20429338W, givenName=JOSE LUIS, sn=PIÑANA SANCHEZ, ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES  
Fecha: 2022.07.15 15:28:10 +02'00'

**Carlos Solano Vercet**

**Dolores Planelles Silvestre**

**José Luis Piñana Sánchez**





# **Agradecimientos**



## **AGRADECIMIENTOS**

A Carlos Solano, quien planteó la idea. Gracias por cederme líneas de la investigación, por tu accesibilidad, atención y la oportunidad brindada.

A Dolores Planelles, por tu disponibilidad, tu docencia y por el regalo de tenerte todos estos años como amiga y maestra.

A José Luis Piñana por buscar la perfección, las clases telemáticas y recordarme la importancia del detalle y del tesón.

A Juan Carbonell por enseñarme a descifrar el lenguaje de los números y su significado. Has sido el ángel que se cruzó en el camino, quedándote al lado.

A toda mi cuna hematológica en el Hospital Arnau de Vilanova.

A Encarna Monzó y Pepe Mayans. Aquí tenéis el fruto de una semilla vuestra. Gracias por crear, desde el comienzo, en ella.

A mis imprescindibles: Nieves Puig y Manuel Álvarez. Gracias por vuestra acogida y permitirme ser vuestra pupila siguiendo vuestra huella.

A Roberto Roig por cambiar mi vida profesional. A Cristina Arbona, Emma Castro y Luis Larrea por vuestra consideración.

A Manu, Rosa, Rocío, Amor, Elvira, Cándido, Paco, Encarna, Paco, Rafi, Luisa, Isabel, Carmen, Estefanía, Rosa, Rafa, Juanma, Maite, Carmen y Pilar, por ser mis manos y llevar a cabo las técnicas o procedimientos que desarrolláis a la perfección y me habéis enseñado.

A personas ajenas al proyecto que en todo momento se han prestado voluntarias para ofrecer su mano y han aportado: Pavlik, Esther, Manolo, Asun, Vicente, Gema, Fran, y Concha.

A José Manuel Alamán, Manuela Leal y resto del equipo del Doctorado por su amabilidad y rapidez para resolver las dudas administrativas y burocráticas durante todos estos años.

A Paula Amat. Con tu dulzura, y la mejor de tus sonrisas, has puesto a cada obstáculo facilidades. Sin ti, y sin tu ayuda en la recolección de muestras, este proyecto no habría sido posible.

A las personas que constan como colaboradores en el proyecto FIS, permitiendo que se llevara a cabo junto con los tres directores de tesis: Paula Amat, Inés Gómez, Jaime Sanz, Lourdes Vázquez, Francisco Boix, Luis Marín, María Jesús Pascual, Abelardo Caballero, Alberto Torío, Teresa Ros, Natalia Martínez y todos los que han contribuido en él sin ser reconocidos.

A los pacientes. Extraño poder tener el contacto que la praxis médica requiere, pero alguien debe obtener la información que aguarda en vuestras muestras biológicas. Gracias por fiaros de la ciencia y consentir que esta avance en el conocimiento aprendiendo de vosotros.

A los amigos y la familia por ser una constante vital, con lo que ello implica. Gracias por vuestro cariño que arroja, mensajes que empujan y sonrisas que dibujáis al tener conciencia de que esto pasará, pero vosotros os quedáis.

A mis padres, Gabriel y María, y a mi hermana Lore, por vuestra confianza, por ser almohada, bastón, raíces, ejemplo de constancia, trabajo, dedicación y sobre todo por vuestro amor incondicional. A Pilar, Alberto, Pipi, Carlos, Pepe y sobris por hacer la vida más bonita y más fácil. Gracias a todos por vuestra ayuda, que ha llegado de tantas formas y maneras. Gracias porque el tiempo que les he “robado” a nuestros niños ha sido para ellos de alegrías, cuidados y diversión. Permitiéndome tener calma porque sabía que estaban en las mejores manos posibles.

A ti, Alberto, MB por ser mi equilibrio, mi filtro, mi guía en la sombra, mi pluma, mi compañero de vida, de senda y el mejor equipo. Tu amor, entrega y serenidad me ha permitido llegar hasta el final, sorteando los momentos de flaqueza, para lograr ese proyecto que comenzó otra yo que no tenía la responsabilidad de la maternidad. Gracias por cumplir, cada día, la promesa que nos realizamos aquel día de Febrero que parecía de Mayo, por ser razón para sentirme bendecida, afortunada y ayudarme a ser mi mejor versión.

A vosotros, Adrián y David. Motor, energía, parte fundamental que orienta mi vida. Que este proyecto os recuerde *“que el partido no termina hasta que termina”* y la importancia del esfuerzo para la superación personal. Gracias por ser las estrellas que dais luz, indicáis el camino y recordáis el sentido.

Familia Pérez Luis: Mamá ya tiene *“su libro”*. Ahora el tiempo vuelve a ser vuestro y, por tanto, nuestro. Más que infinito.

## **Motivación de la tesis**



## MOTIVACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

*“Por amor a la verdad nos debemos a un aprendizaje permanente”*

*S.Woessner. (Libro: La citología óptica en el diagnóstico hematológico)*

Soy especialista en Hematología y Hemoterapia. Esa oración, tan cierta como inspiradora, fue lo primero que me enseñó mi especialidad al abrir el libro de la Dra. S. Woessner siendo residente. Trabajo en un laboratorio en el que, por ser centro especializado que ofrece servicio al resto de hospitales de Castellón y Valencia, las posibilidades de enlazar los resultados de laboratorio de los pacientes y la repercusión clínica de los mismos son prácticamente inexistentes.

Este proyecto ha supuesto una oportunidad para poder conocer directamente la implicación de nuestra *praxis* en los pacientes e ir más allá. A su vez, todo un reto personal y de aprendizaje. También me ha ofrecido la posibilidad de conocer a compañeros de especialidad dedicados al trasplante alogénico, con el respecto y la admiración que me supone, y compañeros dedicados a la Histocompatibilidad que tuvieran las mismas inquietudes, problemas o preocupaciones que surgen en el día a día. Embarcarme en este proyecto me llevó a pensar que podría enriquecerme y ampliar conocimiento en diferentes escalas y áreas. Además, obtener el título de Doctor es indispensable para poder optar a convertirse en personal docente universitario. Si podía acabar aportando algo a la ciencia, mucho mejor. Pero desde luego este proyecto, sin duda, ha servido para conocer, en primera persona, la complejidad de realizar con rigor científico una investigación, aumentando más, si cabe, el reconocimiento a todos aquellos profesionales dedicados a la misma. Gracias a su trabajo y entrega permiten que la Medicina, y el resto de disciplinas, sigan ampliando horizontes y avanzando.





# Índice de contenidos



# ÍNDICE TEMÁTICO

## AGRADECIMIENTOS

## MOTIVACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ÍNDICE TEMÁTICO .....	15
ÍNDICE DE FIGURAS .....	21
ÍNDICE DE TABLAS .....	25
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	29
RESUMEN .....	33

## 1. INTRODUCCIÓN..... 37

### 1.1. EL SISTEMA HLA ..... 37

1.1.1. Descubrimiento de las moléculas de histocompatibilidad..... 37

1.1.2. Organización génica del sistema HLA..... 39

1.1.3. Genes y moléculas del sistema HLA..... 41

1.1.4. Nomenclatura HLA ..... 44

1.1.5. Herencia de los genes *HLA*..... 44

1.1.6. Desequilibrio de ligamiento..... 45

1.1.7. Expresión celular de las moléculas HLA..... 46

1.1.8. Polimorfismo del sistema HLA..... 46

1.1.9. Características principales de las moléculas HLA..... 48

1.1.10. Escape tumoral por alteración en la expresión del HLA ..... 49

### 1.2. TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO ..... 49

1.2.1. Definición..... 49

1.2.2. Revisión histórica del trasplante haploidéntico ..... 50

1.2.3. Trasplante HLA-idéntico vs. trasplante no HLA-idéntico..... 52

1.2.4. Cómo superar la barrera de la histocompatibilidad ..... 53

### 1.3. ALORREACTIVIDAD NK EN EL TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO ..... 60

1.3.1. Células *natural killer* (NK) ..... 61

1.3.2. Papel de las células NK en el TPH .....	63
1.3.3. Tipos de receptores de la célula NK.....	64
1.3.4. Genes <i>KIR</i> .....	65
1.3.5. Nomenclatura y estructura de los genes <i>KIR</i> .....	66
1.3.6. Proteínas KIR.....	67
1.3.7. Organización genética del KIR.....	68
1.3.8. Polimorfismo de los genes <i>KIR</i> .....	69
1.3.9. Herencia combinada.....	69
1.3.10. Ligandos HLA para los receptores KIR .....	71
1.3.11. Modelos de predicción de alorreactividad .....	75
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>87</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. LA COHORTE DEL ESTUDIO .....</b>	<b>91</b>
3.1.1. Pacientes. ....	91
3.1.2. Donantes.....	93
<b>3.2. COMITÉ DE ÉTICA Y COMITÉ CIENTÍFICO .....</b>	<b>95</b>
<b>3.3. VARIABLES REGISTRADAS, DEFINICIÓN Y OBTENCIÓN .....</b>	<b>95</b>
3.3.1. Relacionadas con el receptor .....	95
3.3.2. Relacionadas con el donante.....	96
3.3.3. Relacionadas con compatibilidad entre donante y receptor .....	97
3.3.4. Relacionadas con la enfermedad de base .....	98
3.3.5. Relacionadas con TPH previo .....	99
3.3.6. Relacionadas con criterios de Ciurea y Champlin modificados.....	99
3.3.7. Relacionadas con compatibilidad HLA .....	100
3.3.8. Relacionadas con los modelos de predicción de alorreactividad ..	102
3.3.9. Relacionadas con TPH haploidéntico .....	110
3.3.10. Relacionadas con injerto postrasplante .....	112

3.3.11. Relacionadas con enfermedad injerto contra receptor aguda (EICRa) y crónica (EICRc) .....	113
3.3.12. Relacionadas con situación del paciente y la enfermedad en última visita.....	115
<b>3.4. MUESTRAS, PROCESOS Y TÉCNICAS.....</b>	<b>116</b>
3.4.1. Tipos de muestras analizadas y proceso de recolección.....	116
3.4.2. Técnicas de obtención de datos.....	117
<b>3.5. CRITERIOS DE CALIDAD .....</b>	<b>121</b>
<b>3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>121</b>
3.6.1. Análisis descriptivo.....	122
3.6.2. Análisis univariable .....	123
3.6.3. Análisis multivariable.....	124
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>127</b>
<b>4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS: PACIENTES, DONANTES, ENFERMEDAD Y TPH.....</b>	<b>127</b>
4.1.1. Pacientes .....	127
4.1.2. Donantes.....	127
4.1.3. Pareja D/R .....	128
4.1.4. Fuente de PH y acondicionamiento del haplo-TPH .....	128
<b>4.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL SISTEMA HLA.....</b>	<b>131</b>
<b>4.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO SOBRE ALORREACTIVIDAD NK Y GENOTIPO KIR.....</b>	<b>140</b>
<b>4.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE: INJERTO, EICR, RECAÍDA, MNRR, SLE Y SG .....</b>	<b>147</b>
<b>4.5. ANÁLISIS UNIVARIABLE Y MULTIVARIABLE DE FACTORES DE RIESGO DE LOS DIFERENTES EVENTOS DE INTERÉS: .....</b>	<b>150</b>
4.5.1. EICR.....	151
4.5.2. Recaída.....	155
4.5.3. MNRR.....	157

4.5.4. SLE .....	159
4.5.5. SG.....	162
<b>4.6. ANÁLISIS DEL GRUPO DE PACIENTES CON LMA.....</b>	<b>166</b>
4.6.1. MNRR en LMA.....	166
4.6.2. SLE en LMA.....	168
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>199</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>205</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>229</b>
ANEXO I. CONCESIÓN DE LA BECA FIS.....	229
ANEXO II. HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE .....	230
ANEXO III. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE .....	236
ANEXO IV. HOJA INFORMATIVA AL DONANTE.....	237
ANEXO V. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL DONANTE.....	242
ANEXO VI. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA .....	243
ANEXO VII. INFORME DEL COMITÉ CIENTÍFICO INTERNO DE LA FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA .....	244
ANEXO VIII. HOJA IDENTIFICADORA DEL PACIENTE Y SU DONANTE .....	245
ANEXO IX. TÉCNICAS DE TIPAJE DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	246
ANEXO X. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA .....	299
ANEXO XI. VARIABLES ESTUDIADAS EN EL ANÁLISIS UNIVARIABLE..	312

# Índice de figuras





## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 6.....	39
FIGURA 2. MAPA DE LA REGIÓN GENÉTICA HLA.....	40
FIGURA 3. ORGANIZACIÓN GÉNICA Y ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE I.....	42
FIGURA 4. ORGANIZACIÓN GÉNICA Y ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE II.....	43
FIGURA 5. NOMENCLATURA DE ALELO HLA.....	44
FIGURA 6. MODELO DE HERENCIA DE LOS HAPLOTIPOS HLA.....	45
FIGURA 7. ALGORITMO PARA LA SELECCIÓN DE DONANTE EN ADULTOS.....	53
FIGURA 8. CÉLULAS T Y EFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA.....	57
FIGURA 9. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA CICLOFOSFAMIDA Y SECUENCIA DE LAS ETAPAS DE LA TOLERANCIA INDUCIDA.....	58
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADA PLATAFORMA DE HAPLO-TPH Y SUS COMPONENTES.....	60
FIGURA 11. "PÉRDIDA DE LO PROPIO" ( <i>MISSING-SELF THEORY</i> ).....	62
FIGURA 12. RELEVANCIA DE LAS CÉLULAS NK DEL DONANTE EN EL PACIENTE TRAS TPH.....	63
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN DE LA REGIÓN <i>LEUKOCYTE RECEPTOR COMPLEX</i> (LRC).....	65
FIGURA 14. NOMENCLATURA GENES <i>KIR</i> .....	66
FIGURA 15. ESTRUCTURA PROTEÍNAS <i>KIR</i> .....	67
FIGURA 16. MAPA DE HAPLOTIPOS <i>KIR</i> COMUNES EN POBLACIONES CAUCÁSICAS.....	69
FIGURA 17. HERENCIA GENES <i>KIR</i> Y <i>HLA</i> .....	70
FIGURA 18. ESTRUCTURA DE LOS <i>KIR</i> INHIBITORIOS Y SUS LIGANDOS HLA DE CLASE I.....	73
FIGURA 19. INTERACCIONES HLA- <i>KIR</i> .....	74
FIGURA 20. INCOMPATIBILIDAD LIGANDO-LIGANDO.....	75
FIGURA 21. RECONOCIMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES POR PARTE DE LAS NK.....	77
FIGURA 22. INCOMPATIBILIDAD RECEPTOR-LIGANDO FRENTE A INCOMPATIBILIDAD LIGANDO-LIGANDO.....	78
FIGURA 23. AUSENCIA DE LIGANDO <i>KIR</i> Y COMPARATIVA CON EL RESTO DE MODELOS.....	79
FIGURA 24. MODELO DE HAPLOTIPO <i>KIR</i> .....	81
FIGURA 25. GRUPOS ASIGNADOS EN FUNCIÓN DE LOS GENES <i>KIR</i> CENTROMÉRICOS Y TELOMÉRICOS.....	81
FIGURA 26. <i>B-CONTENT SCORE</i> .....	82
FIGURA 27. DONANTE NEUTRO, FAVORABLE Y ÓPTIMO.....	82
FIGURA 28. ALGORITMO DE SELECCIÓN DE DONANTE HAPLOIDÉNTICO.....	83
FIGURA 29. GENES <i>KIR</i> .....	106
FIGURA 30. ESQUEMAS DE ACONDICIONAMIENTO MA Y AIR.....	111
FIGURA 31. REPRESENTACIÓN DE TODOS LOS LD SIGNIFICATIVOS CON STDRES >3 Y FRECUENCIA HAPLOTÍPICA $\geq 1$ .....	138
FIGURA 32. MEDIANA DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.....	149
FIGURA 33. MEDIANA DE SG.....	150
FIGURA 34. CURVA DE SUPERVIVENCIA (KAPLAN-MEIER) EN FUNCIÓN DEL GRUPO <i>KIR-B</i> DONANTE <i>NEUTRAL</i> VS. <i>BETTER+BEST</i> .....	165
FIGURA 35. CURVA DE SUPERVIVENCIA (KAPLAN-MEIER) EN FUNCIÓN DEL GRUPO <i>KIR-B</i> DONANTE <i>NEUTRAL</i> VS. <i>BETTER</i> VS. <i>BEST</i> .....	166



# Índice de tablas



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. NÚMERO DE ALELOS REGISTRADOS EN LOS <i>LOCI</i> HLA PRINCIPALES.....	47
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MOLÉCULAS HLA.....	48
TABLA 3. TIPO DE RECEPTORES DE LA CÉLULA NK.....	64
TABLA 4. DEFINICIÓN DE INCOMPATIBILIDAD ABO EN EL TPH.....	97
TABLA 5. GRUPOS ASIGNADOS EN FUNCIÓN DE LOS GENES <i>KIR</i> CENTROMÉRICOS Y TELOMÉRICOS.	107
TABLA 6. DETERMINACIÓN DEL HAPLOTIPO <i>KIR</i> Y PUNTUACIÓN DE CONTENIDO <i>KIR-B</i> .....	108
TABLA 7. MODO DE ASIGNAR LA CLASIFICACIÓN: <i>NEUTRAL</i> , <i>BETTER</i> O <i>BEST</i> .....	109
TABLA 8. GRADOS DE EICR AGUDA GLOBAL.....	113
TABLA 9. GRADOS DE EICR CRÓNICA GLOBAL: LEVE, MODERADA, GRAVE.....	113
TABLA 10. EICRC LIMITADA VS. EXTENSA.....	114
TABLA 11. CONCENTRACIÓN DE ADN ÓPTIMA EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA.....	118
TABLA 12. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	128
TABLA 13. FRECUENCIAS ALÉLICAS HALLADAS EN LOS PACIENTES PARA EL <i>LOCUS HLA-A</i> .....	132
TABLA 14. FRECUENCIAS ALÉLICAS HALLADAS EN LOS PACIENTES PARA EL <i>LOCUS HLA-C</i> .....	133
TABLA 15. FRECUENCIAS ALÉLICAS HALLADAS EN LOS PACIENTES PARA EL <i>LOCUS HLA-B</i> .....	134
TABLA 16. FRECUENCIAS ALÉLICAS HALLADAS EN LOS PACIENTES PARA EL <i>LOCUS HLA-DRB1</i> ....	135
TABLA 17. FRECUENCIAS ALÉLICAS HALLADAS EN LOS PACIENTES PARA EL <i>LOCUS HLA-DQB1</i> ....	136
TABLA 18. IMPLEMENTACIÓN DEL TEST DE NEUTRALIDAD EWENS-WATTERSON-SLATKIN.....	137
TABLA 19. PREDICCIÓN DE ALORREACTIVIDAD SEGÚN EL MODELO DE PERUGIA.....	140
TABLA 20. PREDICCIÓN DE ALORREACTIVIDAD SEGÚN EL MODELO DE MEMPHIS.....	141
TABLA 21. MODELO DE AUSENCIA DE LIGANDO- <i>KIR</i> EN RECEPTOR.....	141
TABLA 22. PREDICCIÓN DE ALORREACTIVIDAD SEGÚN EL MODELO DE NANTES.....	142
TABLA 23. DISTRIBUCIÓN EN EL DONANTE DE TIPO DE CENTRÓMERO Y TIPO DE TELÓMERO.....	142
TABLA 24. PREDICCIÓN DE ALORREACTIVIDAD SEGÚN EL MODELO DE STANDFORD.....	143
TABLA 25. PUNTUACIÓN DEL CONTENIDO GENES <i>KIR-B</i> ( <i>B-CONTENT SCORE</i> ).....	143
TABLA 26. FRECUENCIA DEL GENOTIPO <i>KIR</i> ENTRE LOS DONANTES.....	144
TABLA 27. FRECUENCIA DEL GENOTIPO <i>KIR</i> ENTRE LOS RECEPTORES.....	145
TABLA 28. TIPODE DE CENTRÓMERO Y TELÓMERO EN LOS PACIENTES.....	146
TABLA 29. CLASIFICACIÓN DE RECEPTORES EN: <i>NEUTRAL</i> ; <i>BETTER</i> Y <i>BEST</i> .....	146
TABLA 30. <i>B-CONTET SCORE</i> DE LOS RECEPTORES.....	146
TABLA 31. GRUPOS DE HAPLOTIPOS <i>KIR</i> ENTRE DONANTE Y RECEPTOR.....	146
TABLA 32. RESULTADOS POSTRASPLANTE.....	148
TABLA 33. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE EICRA I-IV.....	151
TABLA 34. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE EICRA I-IV.....	152
TABLA 35. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE EICRA II-IV.....	153
TABLA 36. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE EICRA II-IV.....	153
TABLA 37. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE EICRA III-IV.....	154
TABLA 38. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE EICRA III-IV.....	155
TABLA 39. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE RECAÍDA.....	156
TABLA 40. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE RECAÍDA.....	156

TABLA 41. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE LA MNRR.....	158
TABLA 42. VARIABLES TIEMPO-DEPENDIENTES EN LA MNRR. ....	159
TABLA 43. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE MNRR.....	159
TABLA 44. VARIABLES CON POSIBLE IMPACTO EN LA SLE. ANÁLISIS UNIVARIABLE.....	160
TABLA 45. VARIABLES TIEMPO-DEPENDIENTES CON POSIBLE IMPACTO EN LA SLE.....	161
TABLA 46. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE SLE.....	162
TABLA 47. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE SG.....	162
TABLA 48. IMPACTO DE VARIABLES TIEMPO-DEPENDIENTES EN LA SG.....	164
TABLA 49. VARIABLES CON POSIBLE IMPACTO EN LA SG. ANÁLISIS MULTIVARIABLE. ....	164
TABLA 50. RESULTADOS, DEL ANÁLISIS UNIVARIABLE CON LA TOTALIDAD DE PACIENTES, QUE MOTIVAN SUBESTUDIO EN PACIENTES CON LMA.....	165
TABLA 51. ANÁLISIS UNIVARIABLE, MNRR EN LMA. ....	167
TABLA 52. ANÁLISIS UNIVARIABLE, SLE EN LMA.....	168

## **Glosario de abreviaturas**





## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ADE:** anticuerpo anti-HLA donante específico
- AIR:** acondicionamiento de intensidad reducida
- ALO-TPH:** trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- ATG:** *anti-thymocyte globulin (globulina antitimocítica)*
- CFM-post:** ciclofosfamida postrasplante
- CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad
- CMV:** citomegalovirus
- CsA:** ciclosporina
- Cy:** ciclofosfamida
- DE:** donante emparentado
- DNE:** donante no emparentado
- D/R:** pareja donante-receptor
- DRI:** *disease risk index*
- EICRa:** enfermedad de injerto contra receptor aguda
- EICRc:** enfermedad de injerto contra receptor crónica
- Fnd:** desviación normalizada del estadístico de homocigosidad de Ewens-Watterson
- G-CSF:** *granulocyte colony-stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos)*
- GvH:** *graft versus host* (injerto contra receptor)
- Haplo-TPH:** trasplante haploideéntico de progenitores hematopoyéticos
- HLA:** *human leukocyte antigen (antígeno leucocitario humano)*
- HR:** *hazard ratio*
- HvG:** *host versus graft* (receptor contra injerto)
- IA:** incidencia acumulada
- IC:** intervalo de confianza
- ICN:** inhibidor de la calcineurina
- IFM:** intensidad de fluorescencia media

- IS:** inmunosupresión
- KIR:** *Killer-cell immunoglobulin-like receptors.*
- LA:** leucemia aguda
- LD:** *linkage disequilibrium* (desequilibrio de ligamiento)
- LLA:** leucemia linfoblástica aguda
- LLC:** leucemia linfoide crónica
- LMA:** leucemia mieloide aguda
- LMC:** leucemia mieloide crónica
- LH:** linfoma Hodgkin
- LNH:** linfoma no Hodgkin
- MA:** mieloablativo
- MMF:** micofenolato de mofetilo
- MO:** médula ósea
- NMPc:** neoplasia mieloproliferativa crónica
- MNRR:** mortalidad no relacionada con la recaída
- NK:** *natural killer*
- PCR:** *polymerase chain reaction.* Reacción en cadena de la polimerasa
- PH:** progenitores hematopoyéticos
- RC:** remisión completa
- REDMO:** registro español de donantes de médula ósea
- RP:** remisión parcial
- RR:** riesgo relativo
- SCU:** sangre de cordón umbilical
- SG:** supervivencia global
- SLE:** supervivencia libre de enfermedad
- SLP:** síndrome linfoproliferativo
- SMD-AR:** síndrome mielodisplásico de alto riesgo
- SP:** sangre periférica
- Stdres:** *standard residuals*
- TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos



**Resumen**



## RESUMEN

**Introducción:** El trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos (haplo-TPH) es una opción terapéutica cuando no se dispone de donante HLA-idéntico. Con frecuencia, los potenciales receptores disponen de más de un donante haploidéntico. De cara a priorizar un donante sobre otro, las guías internacionales sugieren considerar criterios clínicos, como la edad, la diferencia de sexo, el grupo sanguíneo y el estado serológico de citomegalovirus (CMV) entre la pareja donante-receptor (D/R), y criterios biológicos, como la ausencia de anticuerpos anti-HLA donante específicos (ADE). Sin embargo, existe la posibilidad de analizar otros factores, como la alorreactividad *Natural Killer* (NK), que podrían ser de utilidad para la selección del donante y mejorar los resultados del TPH.

**Objetivos:** Identificar qué factores son relevantes de cara a escoger el mejor donante haploidéntico. Para ello, se analizaron aspectos clínicos generales, estudios inmunológicos de compatibilidad HLA y, especialmente, la relevancia clínica de la alorreactividad NK entre donante y receptor en los resultados del haplo-TPH. Dentro de los distintos modelos de predicción de la alorreactividad NK, este estudio pretende conocer cuál de ellos aporta mayor información y capacidad predictiva en la selección del donante haploidéntico superior.

**Material y método:** Se realizó un estudio prospectivo multicéntrico de 113 parejas D/R. Los pacientes, con diversas hemopatías malignas, tras acondicionamiento tanto mieloablativo (29,2%) como de intensidad reducida (70,8%), recibieron un haplo-TPH no manipulado con fuente de progenitores hematopoyéticos mayoritariamente de sangre periférica (87,6%) asociado a ciclofosfamida postrasplante. Además, pre-TPH se descartó, en todos los receptores, la existencia de ADE.

Se recogieron características clínicas de las parejas D/R, entre las que se incluyeron: edad, sexo, relación de parentesco, estado serológico frente al CMV, compatibilidad ABO, disparidad HLA entre D/R, genotipo *KIR* (*Killer-cell*

*immunoglobulin-like receptors*) y validación de los distintos modelos de predicción de la alorreactividad NK entre D/R.

**Resultados:** La edad media de los receptores del haplo-TPH fue de 54 años (rango 22-72) mientras que la de los donantes fue de 38 años (2-68). Del análisis multivariable se obtuvieron los siguientes resultados. Los factores asociados a un menor desarrollo de EICRa grado II-IV fueron: donante menor de 40 años (HR 0,46 (0,24-0,86); p=0,016); cualquier combinación diferente a serología CMV D-/R+ (HR 0,44 (0,22-0,89); p=0,023) y fuente de PH de médula ósea (HR 0,13 (0,02-0,94); p=0,044). La compatibilidad HLA  $\geq 6/10$  en dirección *GvH* protegió frente a la recaída (HR 0,23 (0,07-0,73); p=0,012). El gen *2DS2*, expresado en el donante, asoció peor supervivencia global (SG) (HR 3,81 (1,10-13,24); p=0,035). Asimismo, la puntuación del contenido de genes *KIR-B* (*B-content score*) del donante con valor de 1 mostró protección en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) (HR 0,48 (0,23-0,99); p=0,048). Además, *B-content score* en el receptor  $\geq 2$ , implicó peor SLE (HR 3,53 (1,45-8,60); p=0,005) y SG (HR 3,12 (1,51-6,45); p=0,002). Por último, el estadio de la enfermedad de base avanzado fue identificado como factor de riesgo para la mortalidad no relacionada con la recaída (MNRR) (HR 16,34 (3,05-87,50); p=0,001) y para la recaída (HR 6,80 (1,70-27,24); p=0,007).

**Conclusiones:** Para escoger al mejor donante haploidéntico, tras descartar ADE, entre los criterios clínicos debe ser priorizado el donante joven (menor de 40 años) y CMV seropositivo. Además, la compatibilidad HLA en dirección *GvH*  $\geq 6/10$  protege frente a la recaída. Respecto a la alorreactividad NK, el modelo del haplotipo KIR junto con *B-content score* (tanto del donante como del receptor), y la información contenida en ellos, son los que han presentado relevancia clínica en esta cohorte de pacientes. Por el contrario, los modelos: ligando-ligando; receptor-ligando; *KIR-KIR* y ausencia de ligando KIR en receptor no han mostrado, en esta investigación, tener efecto sobre: EICRa grado I-IV, II-IV, III-IV; EICRc; recaída; MNRR; SLE ni SG. Tampoco ha tenido impacto, en estos eventos, el sexo del donante o del receptor, la compatibilidad ABO, ni la relación de parentesco.

# **Introducción**





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL SISTEMA HLA

El sistema inmunitario es capaz de detectar y eliminar patógenos extracelulares, así como células infectadas por patógenos intracelulares o transformadas en tumorales. Las células efectoras de la inmunidad adaptativa, los linfocitos T y B, generan una respuesta inmunitaria que es específica frente al antígeno que la desencadena. Pero para poder desencadenar esa respuesta específica el primer paso es el “reconocimiento” del antígeno extraño que está invadiendo el organismo.

La célula central de la respuesta inmunitaria, el linfocito T, es incapaz de reconocer el antígeno en su forma nativa. Solo puede reconocerlo si este ha sido previamente transformado y presentado, por las células presentadoras de antígeno, sobre las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). EL CMH es una región en el genoma, presente en todos los vertebrados con mandíbula, que codifica los componentes centrales del sistema inmunológico(1). En los seres humanos este sistema se conoce como sistema HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos -*Human Leukocyte Antigen*-)(2).

El sistema HLA, por tanto, es un elemento clave para el funcionamiento del sistema inmunitario, debido a su papel crítico en la presentación de antígenos a los linfocitos T y, por consiguiente, en el desarrollo de la inmunidad.

### 1.1.1. Descubrimiento de las moléculas de histocompatibilidad

Los primeros experimentos que revelaron la existencia de las moléculas HLA fueron gestados sobre la base de que, si el éxito de una transfusión de sangre dependía de la compatibilidad entre los grupos

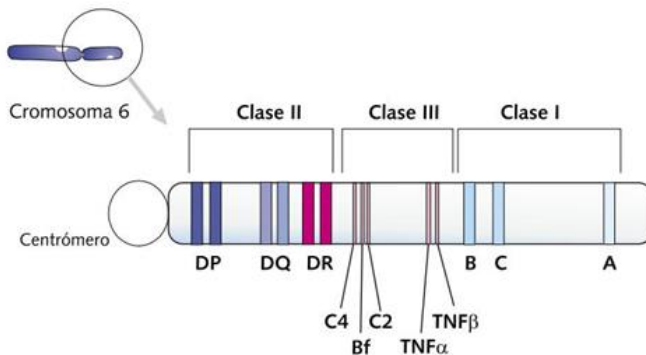
sanguíneos del donante y los del receptor, indicaba que “grupos sanguíneos” similares podían intervenir también en la aceptación o rechazo de otros tejidos trasplantados. Esta idea, sugerida por el Nobel en Medicina y Fisiología Karl Landsteiner en 1930, condujo a Peter Gorer, mientras realizaba estudios sobre injertos en ratones, a identificar, en 1936, grupos de antígenos cuya compatibilidad entre donante y receptor influía en la aceptación o rechazo del tejido injertado. Estas moléculas, que determinaban la compatibilidad o incompatibilidad entre tejidos, se denominaron “moléculas de histocompatibilidad” (3).

Años más tarde, en 1954, Jean Dausset observó que sueros de individuos politransfundidos contenían anticuerpos capaces de aglutinar los leucocitos de otros individuos. En 1958 identificó el primer antígeno leucocitario denominado MAC (más tarde conocido como HLA-A2) y, en 1965, describió el primer sistema de grupos tisulares, el Hu-1, denominado posteriormente sistema HLA o sistema de “antígenos leucocitarios humanos”. En 1980 recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina, junto a George Davis Snell y Baruj Benacerraf (4).

En los años posteriores a su descubrimiento, paralelamente a la identificación de nuevos antígenos HLA, se observó que la razón de la existencia de estas moléculas en los organismos vivos era regular la respuesta inmunológica. El sistema HLA es un conjunto de genes y de las proteínas codificadas por estos, cuya función biológica es presentar antígenos a los linfocitos T (2). Por su implicación en el rechazo de aloinjertos, clásicamente las moléculas HLA se conocen como “antígenos del trasplante”.

### 1.1.2. Organización génica del sistema HLA

El sistema HLA es un conjunto de genes que se sitúan en el brazo corto del cromosoma 6 (región 6p21.1-21.3), ocupando una extensión de 4100 Kbases. Estos genes se distribuyen en tres regiones: clase I, clase II y clase III (5) (Figura 1).



**Figura 1. Brazo corto del cromosoma 6.** Fuente: Vigner *et al.*, 2007(6).

La región de clase I ocupa unos 2000 Kbases y en ella se sitúan los genes que codifican las cadenas  $\alpha$  de las moléculas HLA de clase I “clásicas”. Estos genes se agrupan en tres *loci* principales o “clásicos”: A, B y C. Entre éstos se sitúan otros *loci* “no clásicos”, E, F y G, y varios pseudogenes (H, J, K, L, N, P, S, T, U, V, W, Y) (Figura 2).

La región de clase II ocupa unos 1000 Kbases y en ella se sitúan los genes que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas HLA de clase II clásicas, distribuidos en tres *loci* principales o clásicos: DR, DQ y DP. Hay descritos dos *loci* más – DM y DO –, con genes HLA no-clásicos (DMA, DMB y DOA, DOB). El *locus* DP alberga dos genes, DPA1 y DPB1, y dos pseudogenes, DPA2 y DPB2, que no se expresan. En el *locus* DQ existen cinco genes, DQA1, DQB1, DQB2, DQA2 y DQB3 (estos tres últimos se pueden expresar durante la embriogénesis). El

locus DR alberga cinco genes, *DRA*, *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* y *DRB5*, y cinco pseudogenes, *DRB2*, *DRB6*, *DRB7*, *DRB8* y *DRB9* (Figura 2) (7).

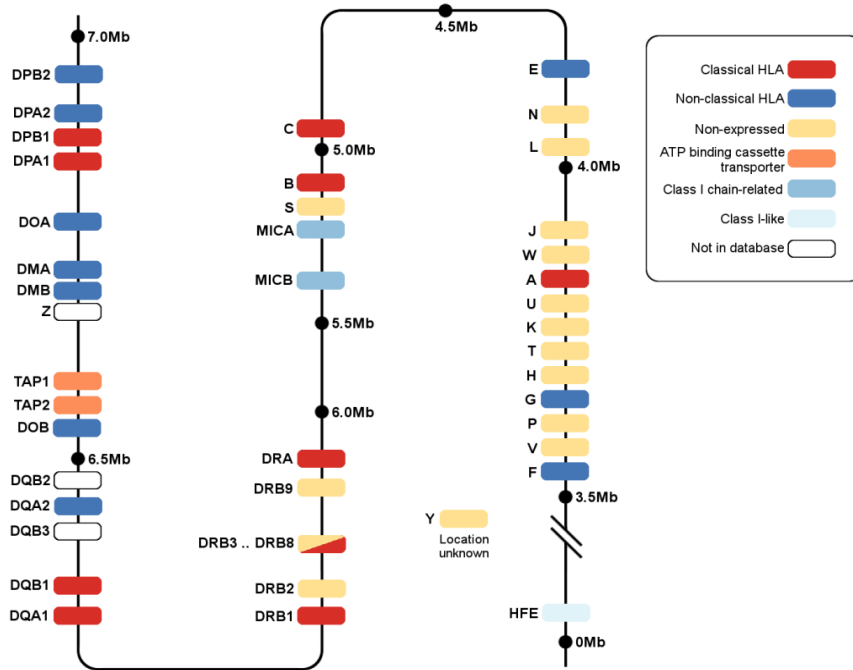


Figura 2. Mapa de la región genética HLA. Fuente: Robinson *et al.*, 2015. <http://hla.alleles.org> (7)

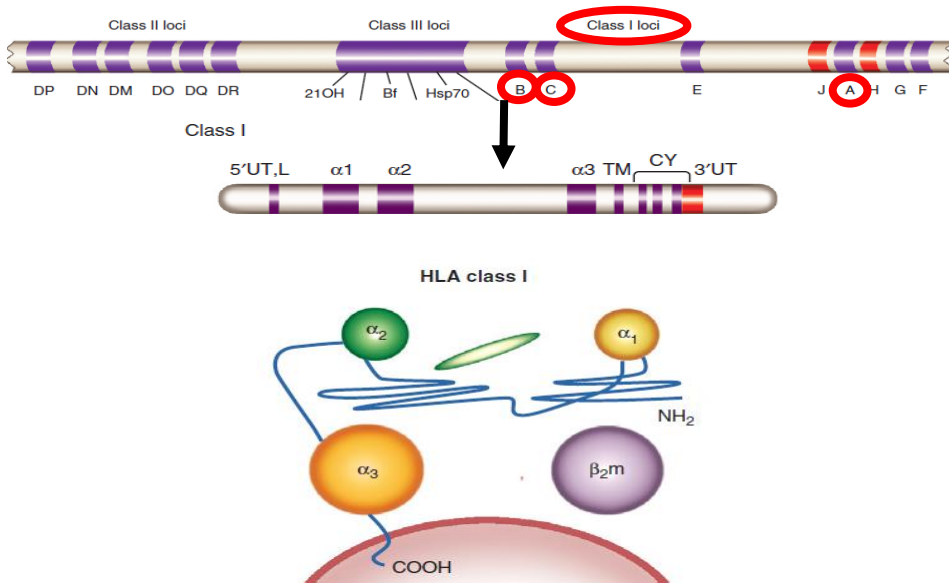
La región de clase III, aunque se sitúa dentro del CMH, contiene genes que codifican moléculas que no son propiamente proteínas de histocompatibilidad pero que tienen funciones importantes en el sistema inmunitario: genes del complemento, *C2*, *C4* y *Bf*, del factor de necrosis tumoral (TNF), de la enzima 21-hidroxilasa o de la familia de proteínas de choque térmico HSP (8).

### **1.1.3. Genes y moléculas del sistema HLA**

Los moléculas codificadas por los genes del sistema HLA son glicoproteínas de membrana y, tanto las de clase I como las de clase II, son heterodímeros (9).

#### ***1.1.3.1. Genes y moléculas HLA de clase I***

Las moléculas de clase I (A, B y C) están constituidas por una cadena polipeptídica pesada  $\alpha$ , codificada en la región HLA, y una cadena ligera, la  $\beta$ 2-microglobulina, codificada fuera del cromosoma 6. La cadena  $\alpha$  está constituida por: tres dominios extracelulares  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3; una región transmembrana y una región intracitoplásmica. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 se proyectan al medio extracelular en  $\alpha$  hélices y una cadena  $\beta$  plegada que es la hendidura de unión con el antígeno para su presentación a los linfocitos T citotóxicos. En el dominio  $\alpha$ 3 se encuentra el sitio de unión a la molécula CD8 del linfocito T citotóxico. Aunque todas las proteínas de clase I tienen esta estructura común, la variabilidad entre los diferentes tipos de moléculas reside precisamente entre los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 que constituyen el “sitio aloantigénico” (diferente de un individuo a otro de la misma especie), concentrándose la mayor parte del polimorfismo en la secuencia de estas moléculas en las llamadas regiones hipervariables. La  $\beta$ 2-microglobulina se une a la cadena  $\alpha$  a través de enlace no covalente al dominio  $\alpha$ 3 y es necesaria para estabilizar la estructura de la molécula de clase I en la superficie celular (10,11)(Figura3).



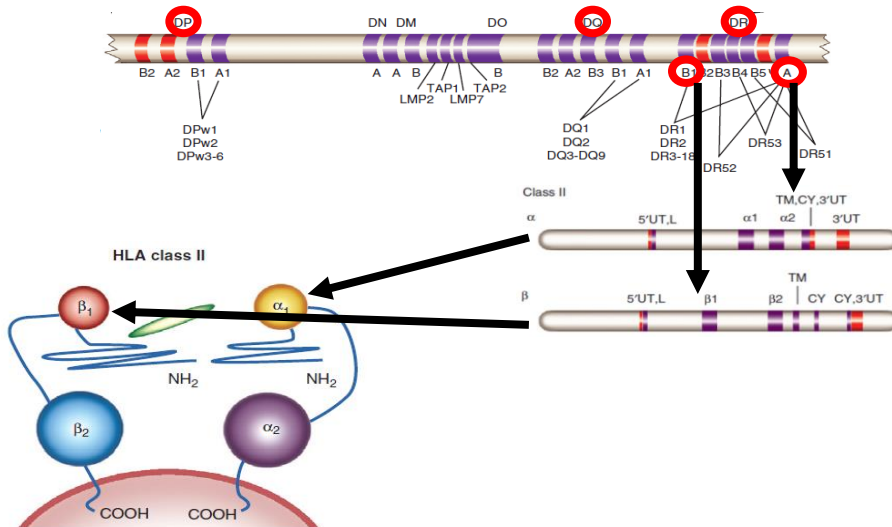
**Figura 3. Organización genética y estructura de las moléculas HLA de clase I.** Se detalla la estructura de un gen de clase I con los exones que codifican los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , la región transmembrana (TM) y la región intracitoplásmica (CY), que darán lugar a la cadena pesada  $\alpha$  de la molécula de clase I que se expresará en la superficie celular junto con la  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ). Fuente: Adaptado de Wang *et al.*, 2012 (12).

### 1.1.3.2. Genes y moléculas HLA de clase II

Las moléculas HLA de clase II, DR, DQ y DP, están constituidas por dos cadenas polipeptídicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , codificadas ambas en la región HLA. Cada una de ellas está constituida por dos dominios extracelulares,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , respectivamente, una región transmembrana y una intracitoplásmica. La variabilidad de esta molécula reside en ambas cadenas, en los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , que son los sitios aloantigénicos. Estos dominios se proyectan al medio extracelular en  $\alpha$  hélices y una cadena  $\beta$  plegada que es la hendidura de unión con el antígeno para su presentación a los linfocitos T CD4+ (13,14).

El locus *HLA-DR* alberga un gen que codifica la cadena  $\alpha$  (*HLA-DRA*) y un gen que codifica la cadena  $\beta$  (*DRB1*). Los productos codificados por ambos

genes se asocian para formar la molécula HLA-DRB1. Además, junto a determinados tipos de moléculas DRB1, se pueden coexpresar otros genes  $\beta$ , *DRB3*, *DRB4* o *DRB5*, cuyos productos se asociarán con el codificado por el gen *DRA* para formar las proteínas HLA-DR52, -DR53 y -DR51, respectivamente. En el *locus DQ* existen cinco genes: *DQA1*, *DQB1*, *DQB2*, *DQA2* y *DQB3*. Los productos codificados por los genes *DQA1* y *DQB1* (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente) se asocian para formar las moléculas HLA-DQ. Finalmente el *locus DP* alberga dos genes: *DPA1* y *DPB1*, que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, de las moléculas HLA-DP, y dos pseudogenes, *DPA2* y *DPB2*. Los productos de los genes *DPA1* y *DPB1* se asocian para formar las moléculas HLA-DP (Figura 4).



**Figura 4. Organización genética y estructura de las moléculas HLA de clase II.**

Estructura de un gen *DRA* y un gen *DRB*, que darán lugar a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, de la molécula HLA de clase II que se expresará en membrana. En cada gen se representan los exones que codifican los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , o  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , la región transmembrana (TM) y la región intracitoplásmica (CY). Fuente: Adaptado de Wang *et al.*, 2012 (12).

### 1.1.4. Nomenclatura HLA

Los alelos HLA se nombran con una combinación de números, letras y símbolos. La identificación de un alelo comienza con el prefijo HLA, seguido de un guion y a continuación el *locus* seguido de un asterisco (\*) y un número único constituido por una serie de hasta cuatro grupos de dígitos separados por dos puntos (:) (15). El primer grupo de dígitos hace referencia al gen, o grupo alélico, y el segundo grupo determina la variante alélica de ese gen. El tercer grupo de dígitos se utiliza para identificar los subtipos alélicos que se distinguen por sustituciones sinónimas en la región codificante del ADN. Finalmente, el cuarto grupo de dígitos se utiliza para identificar los subtipos alélicos que muestran diferencias en la región no-codificante (7,15,16) (Figura 5).

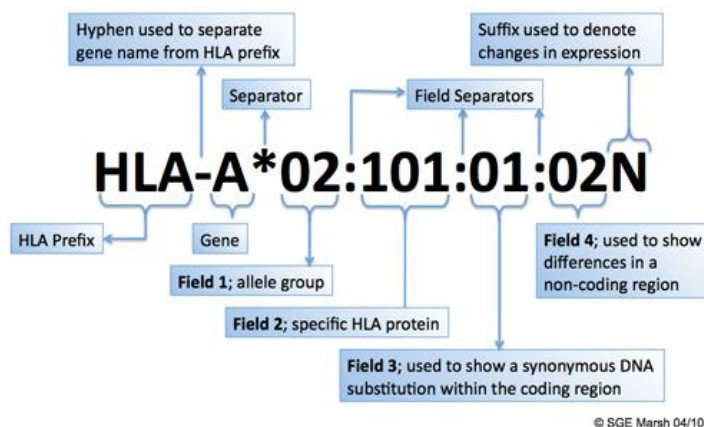


Figura 5. Nomenclatura de un alelo HLA. Fuente: Robinson *et al.*, 2000 (15,16).

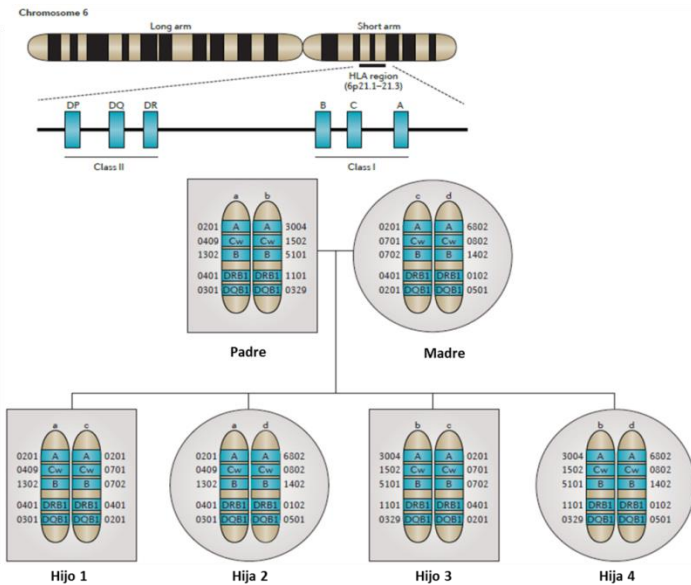
### 1.1.5. Herencia de los genes HLA.

Debido a su estrecha proximidad física en el cromosoma, los genes *HLA* se heredan en bloque (con la excepción de los sucesos de recombinación), de tal manera que un gen *A* se hereda ligado a un gen *B*, a un *C*, a un *DR*, a un *DQ* y a un *DP*, constituyendo lo que se llama un haplotipo HLA (Figura 6). La frecuencia más alta de recombinación (1 a 5%), en la región HLA, es a nivel



*DPB1* (al menos 1 “hotspot” entre *DQ* y *DP*). Los haplotipos son transmitidos siguiendo una pauta dominante mendeliana: cada individuo hereda un haplotipo materno y uno paterno, constituyendo lo que se denomina genotipo HLA (17) (Figura 6).

A veces, ciertas combinaciones de alelos HLA aparecen con más frecuencia en la población de lo que cabría esperar si estuvieran asociados al azar. Es lo que se denomina “desequilibrio de ligamiento” del HLA.



**Figura 6. Modelo de herencia de los haplotipos HLA.** Paternos (a y b) y maternos (c y d) y las cuatro combinaciones de haplotipos posibles en la primera generación filial. Fuente: Kanakry *et al.*, 2016 (17).

### 1.1.6. Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD, por su acrónimo en inglés, *Linkage disequilibrium*) se define como la asociación no aleatoria de alelos en dos *loci*. La medición del desequilibrio de ligamiento proporciona un medio para evaluar la probabilidad de que se observen pares de alelos en el mismo haplotipo y tiene importantes implicaciones en el análisis de datos inmunogenéticos para la

asociación de estudios, por ejemplo, de alelos del sistema HLA en la población y asociaciones de HLA-enfermedad (18).

### **1.1.7. Expresión celular de las moléculas HLA.**

Las moléculas HLA se expresan de forma constitutiva en la célula, es decir, constantemente se están sintetizando y expresando en su superficie, y siempre están presentando un péptido antigénico (propio o extraño) a los linfocitos, ya que en su ausencia son inestables. Las moléculas HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas del organismo y en las plaquetas, mientras que las de clase II solo se expresan en las células presentadoras de antígeno, como son las células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos y algunas células endoteliales.

Las moléculas HLA se expresan de forma codominante, esto es, cada individuo expresa los productos de los genes *HLA* transmitidos por ambos progenitores. Un fenotipo HLA típico incluiría dos tipos de los productos codificados por cada gen *HLA*: dos *A*, dos *B*, dos *C*, dos *DR*, dos *DQ* y dos *DP*, iguales o diferentes según el individuo sea homocigoto o heterocigoto, respectivamente.

### **1.1.8. Polimorfismo del sistema HLA**

La naturaleza polimórfica del sistema HLA determina su función como moléculas presentadoras de antígeno. Por una parte, el sistema HLA es poligénico es decir, está constituido por diferentes genes *HLA* de clase I y de clase II. A nivel individual, cada persona tiene un conjunto de 12 genes *HLA* (distribuidos en dos haplotipos, materno y paterno, cada uno con un gen *A*, un *B*, un *C*, un *DR*, un *DQ* y un *DP*). Todas las células nucleadas expresarán las 6 moléculas de clase I, pero las células presentadoras de antígeno expresarán 12 moléculas HLA, 6 de clase I y 6 de clase II, y cada tipo con diferentes rangos de

especificidad de unión al péptido. Por otra parte, para poder presentar la inmensa variedad de antígenos, las moléculas HLA deben ser extremadamente polimórficas. De hecho, el HLA es el sistema genético más polimórfico que se conoce hasta la fecha, entendiéndose dicho polimorfismo como la multiplicidad de variantes o alelos en que cada gen puede manifestarse(2). El nivel de diversidad observado es tal que se ha descrito como sistema “hiperpolimórfico” en lugar de polimórfico (19,20). Así, según la última actualización de la base de datos internacional del HLA, IMGT/HLA (16) (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>, acceso junio de 2022), hay registrados 33490 alelos HLA, de los cuales 24308 son de clase I y 9182 de clase II (Tabla 1).

**Tabla 1. Número de alelos registrados en los *loci* HLA principales.** Fuente: Adaptado de Robinson *et al.* 2015, (7).

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>DRB1</i>	<i>DQB1</i>	<i>DPB1</i>
Alelos	7452	8849	7393	4018	2230	1958

Los polimorfismos en la secuencia de las proteínas HLA se localizan en los bolsillos de la hendidura de unión con el antígeno y suponen la base estructural para las diferencias de unión al péptido: diferentes variantes alélicas unen péptidos diferentes con distinta eficiencia y esto influye en la activación de la célula T y gobierna la respuesta frente a la no-respuesta del sistema inmunitario (21). Ello puede explicar que diferentes individuos, con distintos genotipos HLA, generen una respuesta inmunitaria con diferente eficiencia frente al mismo patógeno (inmunidad poblacional). Diferentes péptidos pueden ser presentados por la misma molécula HLA, siempre que tengan unas características similares entre sí.

### 1.1.9. Características principales de las moléculas HLA

Como ya se ha comentado anteriormente, la función biológica de las moléculas HLA es la presentación de antígenos a los linfocitos T. El tipo de antígeno determina el modo de procesamiento, la clase de molécula HLA presentadora y el tipo de linfocito T efector de la respuesta inmunitaria específica frente a dicho antígeno (22–25). En la tabla 2 se resumen las características principales que diferencian las moléculas HLA de clase I y de clase II.

Tabla 2. Características de las moléculas HLA.

Característica	HLA-Clase I	HLA-Clase II
<b>Principales loci</b>	<i>HLA-A, HLA-B, HLA-C</i>	<i>HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP</i>
<b>Tipo del péptido antigénico que presentan</b>	Citoplásmico (propios o sintetizados <i>de novo</i> en el citosol celular)	Exógeno (internalizado por fagocitosis/endocitosis)
<b>Célula procesadora del antígeno</b>	Cualquier célula nucleada, célula tumoral o infectada por virus	Células presentadoras de antígeno
<b>Linfocito T respondedor</b>	T citotóxico CD8+	T <i>helper</i> CD4+
<b>Estructura (cadenas polipeptídicas)</b>	Una cadena pesada $\alpha$ (44–47 kD) unida de modo no covalente a la $\beta$ 2-microglobulina (12 kD)	Una cadena $\alpha$ (32–34 kD) unida de modo no covalente a una cadena $\beta$ (29–32 kD)
<b>Sitio de unión con el antígeno</b>	Dominios $\alpha$ 1 y $\alpha$ 2	Dominios $\alpha$ 1 y $\beta$ 1
<b>Sitio de unión al correceptor de la célula T</b>	CD8 se une al dominio $\alpha$ 3	CD4 se une al dominio $\beta$ 2
<b>Tamaño de los péptidos en el sitio de unión con el antígeno</b>	Péptidos de 8–11 residuos (extremos del péptido encajados en la hendidura)	Péptidos de 10–30 residuos o más (extremos del péptido sobresalen de la hendidura)

### 1.1.10. Escape tumoral por alteración en la expresión del HLA

Algunas variantes tumorales pueden sufrir alteraciones en la expresión de sus genes HLA de clase I, lo que conduce a la pérdida de las moléculas que presentan los antígenos específicos tumorales a los linfocitos T y, por consiguiente, a la evasión del reconocimiento inmunológico. Aunque ello supone una ventaja inmunológica del tumor para proliferar, dicha pérdida del HLA propio induce, por otra parte, la actividad antitumoral de las células *Natural Killer* (NK), conectando así con mecanismos de la inmunidad innata (26).

## 1.2. TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO

### 1.2.1. Definición

El trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos (haplo-TPH) es aquel en el que donante y receptor comparten la herencia de una copia idéntica del cromosoma 6 (que contiene los genes del sistema HLA). Por tanto, los donantes haploidénticos deben ser emparentados (DE) para asegurar que el haplotipo compartido es idéntico en todos los *loci* HLA. En caso de ser donante no emparentado (DNE), el término correcto sería “fenotípicamente haploidéntico” ya que, para serlo genotípicamente, se debería conocer la cigosidad para cumplir los requisitos que conlleva ser haploidéntico a un individuo concreto. Sin embargo, puede darse la circunstancia de que la otra copia del cromosoma 6, aunque no sea idéntica, pueda tener compatibilidad extra en un número variable de moléculas HLA de clase I y/o II. Esto conlleva que un donante haploidéntico pueda tener una compatibilidad con el paciente superior a 5/10 (considerando los *loci HLA-A, B, C, DRB1, DQB1*) basándose en la presencia de compatibilidad parcial en la otra copia del cromosoma 6 no compartido (17).

El concepto en inglés “*half-matched*” o “*full haplotype mismatch donor*” en ocasiones se ha empleado como sinónimo de “haploidéntico”, no siendo del todo correcto, ya que el primer término queda englobado en el segundo, pero no a la inversa. Es decir, el término “*half-matched*” se refiere a aquellos individuos en los que una de las copias del cromosoma 6 es HLA-idéntica y la otra es completamente incompatible respecto a los genes expresados por el sistema HLA (17).

### **1.2.2. Revisión histórica del trasplante haploidéntico**

Entre 1974-1979 se sometieron a haplo-TPH 39 pacientes usando médula ósea (MO) de donantes fenotípicamente haploidénticos (tanto *half-matched* como HLA fenotípicamente idénticos). Los resultados fueron los siguientes: de los 29 pacientes con hemopatías malignas la mortalidad no relacionada con la recaída (MNRR) fue del 41% (el 10% falleció por fallo de injerto primario o injerto pobre y el 7% desarrolló enfermedad injerto contra receptor (EICR) con desenlace fatal); de los 10 receptores con anemia aplásica uno falleció por infección, cuatro por EICR, y cinco tuvieron fallo de injerto. Además, de los 13 pacientes que lograron sobrevivir seis eran serológicamente HLA-compatibles con sus donantes (17,27).

En 1983 se publicó el primer estudio de investigación sobre haplo-TPH de MO donde se escogieron familiares de primer grado, no HLA-idénticos, para tratar a 35 pacientes. De ellos, el 29% desarrolló fallo de injerto, el 17% falleció a consecuencia de EICR y el 34% por síndrome inflamatorio sugestivo de EICR hiperaguda. De los 12 pacientes con edad superior a 30 años, ninguno sobrevivió (28).

Posteriormente, en el periodo comprendido entre 1985 y 1990 investigadores de *Fred Hutchinson Cancer Research Center* publicaron los

resultados obtenidos empleando haplo-TPH de MO en 105 pacientes con hemopatía maligna y compararon los resultados frente a 728 pacientes tratados con hermanos HLA-compatibles. Solo seis, de los 105 pacientes de la rama de haplo-TPH, eran “*half-matched*” mientras que el 71% eran idénticos fenotípicamente o solo tenían una incompatibilidad HLA dentro de los seis antígenos tipados serológicamente (HLA-A, HLA-B y HLA-DR). Contrastándolos, el fallo o retraso del injerto fue del 24% en el primer grupo frente a 14% en el segundo. Del mismo modo, la EICR aguda (EICRa) grado II-IV aconteció en el 70% frente al 42%, respectivamente. Ambas diferencias alcanzaron la significación estadística. El riesgo de EICR se incrementaba de modo significativo (un 1,95%) por cada incompatibilidad por *locus* HLA entre donante y receptor. Asimismo, se observó una incidencia menor de recaída tras el procedimiento del haplo-TPH. Sin embargo, esta mejora quedaba contrarrestada por la toxicidad excesiva que condicionó una peor supervivencia (29).

El registro internacional de trasplantes de MO (IBMTR), analizó los resultados de 2055 pacientes que recibieron TPH alogénico (alo-TPH) entre 1985-1991 empleando distintos tipos de donantes (17,29). Aquellos receptores de DE HLA compatibles demostraron tener resultados significativamente mejores, que el resto de cohortes de donantes, respecto a la tasa de injerto, EICRa grado II-IV y III-IV así como EICR crónica (EICRc). Además, la MNRR a los tres años superó el 50 % en la cohorte que recibió TPH de donantes alternativos frente al 21% de los tratados con alo-TPH HLA compatible. La alta toxicidad demostrada y asociada al haplo-TPH de MO, utilizando un esquema de profilaxis de EICR estándar, supuso el abandono de esta práctica que pasó a considerarse no recomendada quedando en el olvido (17).

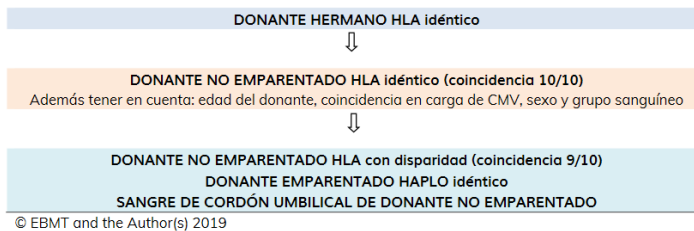
### **1.2.3. Trasplante HLA-idéntico vs. trasplante no HLA-idéntico**

El estándar de oro como donante ideal es el familiar HLA-idéntico. Pero por la herencia mendeliana, por segregación de haplotipos, cada individuo cuenta con un 25% de posibilidades de ser HLA-idéntico con cada uno de sus hermanos. Por tanto, un 75% de los pacientes candidatos a alo-TPH van a necesitar iniciar búsqueda de DNE, sangre de cordón umbilical (SCU) o donante haplo-idéntico entre sus familiares (30). La posibilidad de encontrar un DNE HLA-idéntico en el registro mundial de donantes depende de la diversidad de antígenos HLA dentro de la población y de la raza/etnia del paciente. Además, el tiempo transcurrido desde el inicio de la búsqueda hasta la selección del donante implica un periodo cuya mediana es de 26 días, con una probabilidad actuarial de encontrar un donante, con compatibilidad aceptable (hasta 1 diferencia HLA), antes de dos meses del 93%, datos de la última memoria emitida por el registro español de donantes de médula ósea (REDMO) (31). Hay algunas patologías y situaciones clínicas de pacientes en las que este periodo puede implicar progresión de la hemopatía de base e incluso la muerte (32). Asimismo, alrededor del 30-40% de los pacientes no disponen de donante HLA-idéntico ni compatible (tanto DE como DNE) con la rapidez clínicamente necesaria (33). Este hecho, motivó que se retomara la iniciativa del haplo-TPH como fuente alternativa de progenitores hematopoyéticos (PH), al igual que la SCU.

Se ha estimado que la opción del haplo-TPH permite que más del 95% de los pacientes puedan encontrar, al menos, un donante haplo-idéntico entre su familiares (34) ya que entre hermanos, padres, tíos, abuelos, incluso primos, podría identificarse una pareja donante-receptor (D/R) haplo-idéntica. Por tanto, entre las ventajas del haplo-TPH se puede destacar que aumenta la posibilidad de hallar donante entre los familiares, lo que ayuda a reducir los tiempos de espera, por la implicación personal y cercanía que conlleva un



donante familiar, así como la reducción de costes de búsqueda y adquisición (35) facilitando la sostenibilidad del sistema sanitario. También, respecto a SCU, la fuente de PH está inmediatamente disponible, pudiendo emplearse el mismo donante para terapias celulares postrasplante, en caso de necesidad, por ejemplo, para prevenir o tratar la recaída o infecciones virales mediante la obtención, y posterior infusión, de linfocitos T seleccionados (CD45RA negativos). Otra diferencia estriba en el limitado número de PH presentes en una unidad de SCU. Sin embargo, en el donante haploidéntico se puede obtener la cantidad de PH deseada repitiendo, si es necesario, el procedimiento de obtención en el donante (32). De ahí que se retomara esta alternativa (Figura 7), pese a sus resultados infructuosos del pasado, intentando implementar regímenes de acondicionamiento y tratamiento postrasplante adecuados para superar la toxicidad objetivada debida a la incompatibilidad HLA elevada que conllevaba tasa de fallo de injerto, EICR, MNRR e infección inadmisibles en comparación con el trasplante HLA-idéntico.



**Figura 7. Algoritmo para la selección de donante en adultos.** Fuente: Carreras *et al*, 2019 (36).

#### 1.2.4. Cómo superar la barrera de la histocompatibilidad

Existen tres plataformas para mitigar la intensa respuesta inmunológica y bidireccional de los linfocitos T en el haplo-TPH (Figura 11). Ésta, se desencadena por la incompatibilidad HLA que implica que los linfocitos T de

D/R responden a moléculas HLA-allogénicas cuyo resultado supone incidencias inaceptables de rechazo del injerto, de EICR e infección (33).

#### **1.2.4.1. Acondicionamiento mieloablativo y depleción de células T con megadosis de CD34+**

Las células T se consideran mediadores clave de la EICR y del fallo del injerto. De hecho, el contenido de células T del injerto se asocia con el riesgo de EICR (17,37). Por ello, se desarrollaron técnicas para eliminar las células T del donante, previo a la infusión del aloinjerto. Sin embargo, estudios sucesivos desvelaron que el problema de fallo de injerto se mantenía (afectando a más del 20% de los receptores de TPH con depleción previa de linfocitos T). Además, al eliminar los linfocitos T del donante disminuye la respuesta en dirección injerto contra receptor (*GvH*) con lo que el injerto del donante es más susceptible de ser rechazado por el receptor. De hecho, se descubrió que el fracaso del injerto se asociaba con la aparición de células T anti-donante en el paciente que habían sido resistentes al acondicionamiento (38). Más allá del rechazo inmunomediado, el fracaso del injerto parecía estar relacionado con la dosis de PH infundidos. En modelos de ratón se comprobó que con la infusión de megadosis de células CD34+, obtenidas de MO, con depleción de células T, se lograba el injerto del donante. De este modo ocurría mayor competencia de los PH en el nicho medular pero, a su vez, las células CD34+ directamente inhibían la alorreactividad de las células T.

En Perugia, Italia, teniendo como objetivo mejorar el injerto se pensó en la opción de eliminar las células T del receptor intensificando el protocolo de acondicionamiento con tiotepa, ciclofosfamida (Cy), irradiación corporal total así como globulina antitimocítica (ATG). Además, se combinaba obtención de PH del donante tanto de MO como de sangre periférica (SP). Este protocolo obtuvo tasas muy bajas de EICR, pero se asoció con funcionalidad pobre de las

células T y esto elevaba la MNRR debida principalmente a infección (sobre todo viral) (17). No obstante, se comenzó a observar que el efecto antileucémico se conservaba, a pesar de la depleción de linfocitos T CD3+, gracias al efecto injerto contra tumor de las células NK alorreactivas (39).

#### ***1.2.4.2. Modulación in vivo de injertos que contienen células T empleando protocolo GIAC.***

Este protocolo viene de su acrónimo en inglés: “**G**”-CSF, estimulación del donante mediante factor estimulante de colonia granulocitaria; “**I**”ntensified immunosuppression (inmunosupresión intensificada por el empleo de ciclosporina A (CsA) postrasplante, micofenolato de mofetilo (MMF) y metotrexato de corta duración; “**A**”ntithymocyte globulin (ATG) añadida al acondicionamiento para prevenir la EICR y facilitar el injerto) y “**C**”ombination (combinación de injertos de SP y de MO) (17).

Las células T de MO movilizadas bajo la influencia de G-CSF son menos proliferativas, con reducción de la producción de citocinas Th1 e incremento de la IL-4 (citocina Th2) lo que conlleva, en modelos murinos, mejora en la supervivencia y reducción de la EICR (40,41).

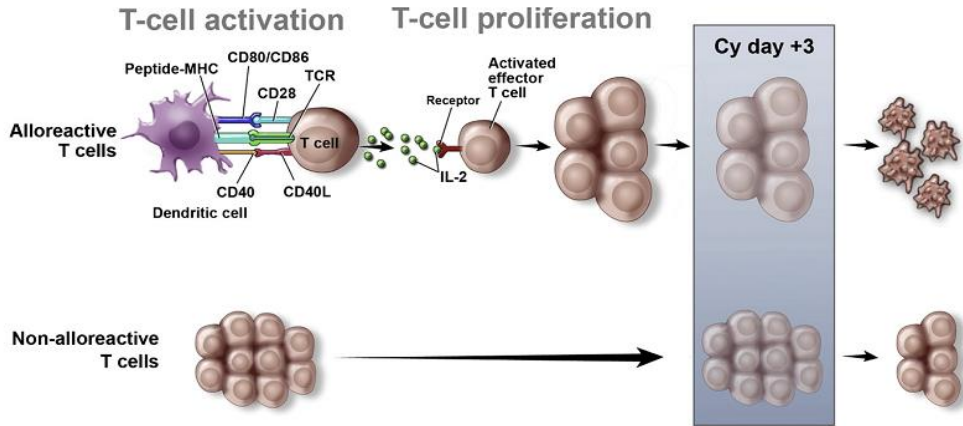
Este protocolo comenzó a emplearse en China, Pekín, en el Hospital General de la Fuerza Aérea (con injertos de MO) y en la universidad de Pekín (con injertos combinados de MO y SP) (42). Este tipo de plataforma tiende a lograr injerto primario universal con recaída limitada y supervivencia libre de enfermedad (SLE) favorable. Sin embargo, conlleva tasas elevadas de EICR, concretamente EICRc (17).

### **1.2.4.3. Altas dosis de ciclofosfamida postrasplante**

Los primeros datos de la inmunotolerancia generada por la Cy son de 1959, año en el que Schwartz y Dameshek lograron demostrar en conejos la inhibición de la formación de anticuerpos mediante la administración de 6-mercaptopurina (43). El estímulo aloinmunizante eran inyecciones endovenosas repetidas de albúmina humana (33).

En el contexto alogénico fue en 1963 cuando, según los estudios de Berenbaum y Brown, se utilizó por primera vez la Cy a dosis altas para evitar, en modelos murinos, el rechazo de injertos cutáneos, observándose que la administración del fármaco en los cuatro días posteriores al injerto prolongaba la supervivencia del mismo (con efectividad mayor si se recibía tras el segundo día después de la intervención) (17,44).

Con esta estrategia, el inóculo de PH, de MO o de SP, es infundido al paciente sin haber sido manipulado, lo que permite a los linfocitos T alorreactivos proliferar hasta el día +3 o +4 después del trasplante. El paciente recibe entonces Cy que produce una depleción de linfocitos T in vivo. Como se ha demostrado, la administración precoz de la ciclofosfamida postrasplante (CFM-post) provocaría una forma de tolerancia inmunológica fármaco-inducida, con sensibilidad incrementada al efecto citotóxico de la Cy por parte de los linfocitos T proliferantes (alorreactivos), quedando preservados de su efecto los linfocitos T no alorreactivos (32) (Figura 8).



**Figura 8: Células T y efecto de la ciclofosfamida (Cy).** Las células T alorreactivas son más sensibles al efecto de la Cy comparado con el resto de células T. Fuente: Luznik *et al*, 2008 (45).

Sin embargo, se han descrito tres mecanismos alternativos que explican el efecto de la Cy cuando se usa en un contexto específico (dosis altas y después de la infusión de MO): eliminación selectiva de células T alorreactivas de donante y receptor; inducción de células T supresoras; y delección clonal intratímica de los precursores de células T alorreactivas que reconocen antígenos del receptor y que aseguran la tolerancia a largo plazo (46,47)(Figura 9).

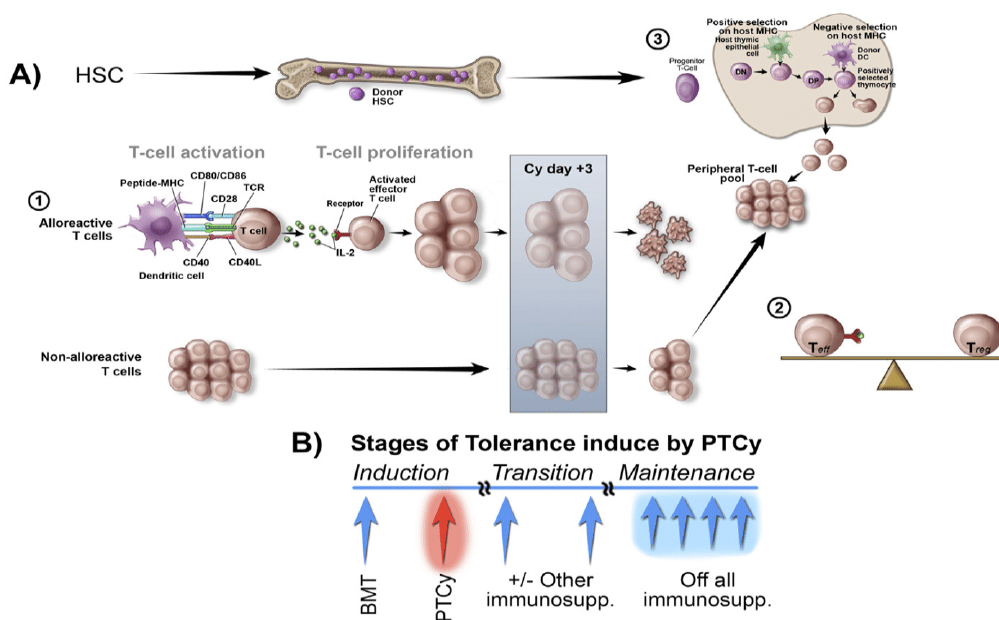


Figura 9. Mecanismos de acción de la Cy (A) y secuencia de las etapas de la tolerancia inducida por Cy (B). Fuente: Luznik *et al.*, 2012 (33).

Las altas dosis de Cy, administrada poco después de la infusión de PH haploideénticos, depleciona las células T alorreactivas del donante y receptor con lo que puede inhibir tanto el desarrollo de la EICR como del rechazo del injerto, respectivamente (48). La tolerancia no se puede inducir si el receptor se ha inmunizado previamente frente a las células del donante. De ahí que la Cy solo pueda favorecer la inmunotolerancia si se administra poco después de la primera exposición a los antígenos del donante CFM-post con poder aloinmunizante (33).

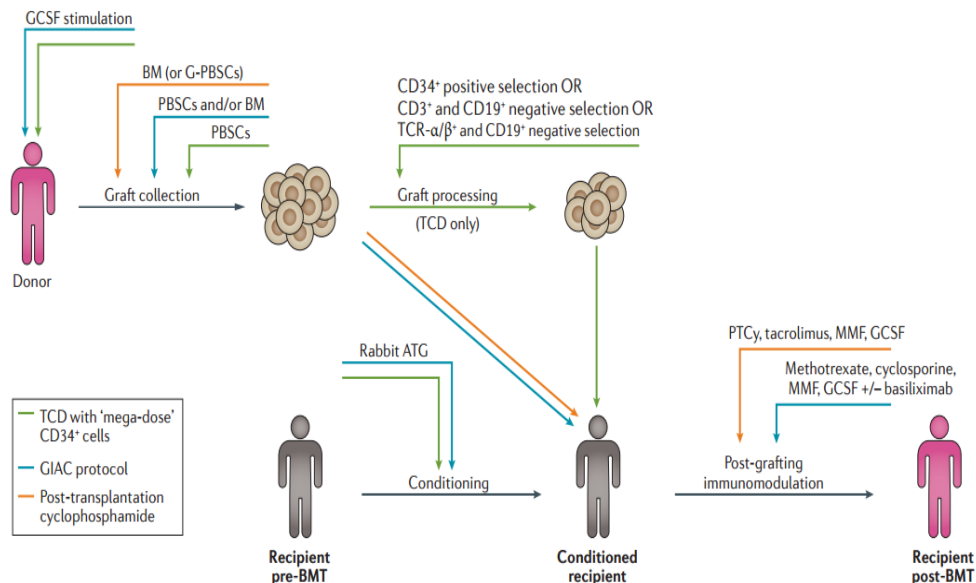
La plataforma desarrollada por el grupo del Hospital Johns Hopkins, en Baltimore, haplo-TPH sin manipulación con el empleo de PH de MO asociada a altas dosis de CFM-post, comenzó a expandir su uso desde 2008 (16). Recientemente, modelos murinos de TPH han revelado nuevos mecanismos a

través de los que la CFM-post es una estrategia efectiva, incluyendo la reducción de la proliferación de las células T CD4+ efectoras alorreactivas, deterioro de la supervivencia de las células T CD4+ y CD8+ alorreactivas y recuperación a favor de las células T reguladoras (46).

La Cy es un agente alquilante que actúa interaccionando con las bases nitrogenadas (nucleótidos) de la cadena de ADN provocando escisión de la doble hélice (cadena) y la activación de los sensores de ADN dañado que activarán mecanismo de reparación o inducción a la apoptosis. Como agente alquilante, actúa en todas las fases del ciclo celular, pero lo hace de forma más intensa en las fases G1 y S, por ello su acción es más intensa en los linfocitos en proliferación (alorreactivos). Es decir, la Cy tiene toxicidad selectiva para las células en división. El efecto de la Cy en los PH es mucho menor, debido al contenido alto en la enzima aldehído deshidrogenasa, por tanto, su empleo post-TPH es seguro en cuanto a injerto hematopoyético (19).

La Cy es un derivado de las mostazas nitrogenadas que se metaboliza a nivel hepático por la citocromo P-450 a la forma 4-hidroxíciclofosfamida, que es hidrolizada generando metabolitos activos, mostaza fosforamida y acroleína, que interfieren en la replicación del ADN y transcripción del ARN induciendo a la apoptosis celular (47).

En la figura 10 se representan las tres plataformas de trasplante haploidéntico.



**Figura 10. Representación esquemática de cada plataforma de haplo-TPH y sus componentes.** Fuente: Kanakry *et al.*, 2016(17).

### 1.3. ALORREACTIVIDAD NK EN EL TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO

Hay estudios que defienden que en hemopatías malignas, como la leucemia aguda (LA), síndrome mielodisplásico de alto riesgo (SMD-AR) y síndromes linfoproliferativos (SLP), la alorreactividad NK en el haplo-TPH disminuye la recaída (mediada por su efecto injerto frente a tumor), el desarrollo de EICR (porque las células NK del donante destruirían las células presentadoras de antígeno del receptor, que, a su vez, son parte de las que median la respuesta injerto contra receptor de los linfocitos T del donante), el rechazo del injerto (por la lisis de las células T del receptor a través de las NK del donante) y las complicaciones infecciosas (a través de su función antiviral). Además, aumenta el éxito del injerto (mediado por la liberación de citoquinas por parte de la célula NK que favorecen la hematopoyesis), de la reconstitución inmune y de la supervivencia global (SG) (49).



### 1.3.1. Células *natural killer* (NK)

La célula agresora o NK forma parte, junto con los fagocitos, de la inmunidad innata. Es la tercera población linfoide en el compartimento mononuclear (suponen el 5-15% de los linfocitos de SP) (50) y su misión consiste en desencadenar respuesta frente a la infección, fundamentalmente viral, o transformación tumoral de las células del organismo. Esta función la comparte con los linfocitos T citotóxicos (CD8+), aunque éstos forman parte de las células implicadas en la inmunidad adaptativa. A su vez, es la primera población linfoide que aparece tras TPH (51).

Históricamente, se describió su función en 1971 por Cudkowicz y Bennett, recibiendo el nombre de *Complement Independent Plaque Forming Cells* (CIPFC); en 1975 se demuestra, *in vitro*, su capacidad citotóxica tumoral y se redefinen como células NK; en 1978 se descubre además, la función antiviral de la NK; en 1987 se postula que pueden mediar rechazo de injerto de MO y en 2002 se definen los fenotipos de la células NK, tanto inmadura como madura (52).

Tanto las células NK como los linfocitos T citotóxicos provienen de un mismo progenitor linfoide que les lleva a compartir rasgos morfológicos, fenotípicos y funcionales (53). Al igual que los linfocitos T y linfocitos B (células de inmunidad adaptativa), durante su desarrollo las NK reciben educación/licencia, poseen receptores y durante una infección son capaces de expandirse clonalmente y generar células de memoria (54). Se diferencian de los linfocitos T en los receptores y el mecanismo para reconocer las células sanas frente a las afectas. Mientras que el linfocito T expresa receptores activadores de célula T, la NK tiene receptores tanto activadores como inhibidores y, en función del estímulo que reciban, generan una respuesta diferente (54,55). El receptor de célula T no se activa si las células expresan los

péptidos propios del sistema HLA de clase I del individuo. El modo en el que dicho receptor puede desencadenar la citólisis es la detección de un péptido viral cargado en el surco de las moléculas de HLA de clase I. Sin embargo, en la célula NK, los receptores que reconocen las moléculas HLA de clase I son los inhibidores y, en situaciones fisiológicas, generan señales que detienen la actividad lítica espontánea de la NK. En cambio, la disminución o alteración en la expresión celular de moléculas HLA de clase I debido a infección viral, transformación tumoral u otras formas de estrés mitiga la influencia inhibitoria en la NK, permitiéndole a éstas ejercer su función para eliminar las células dañadas. Este fenómeno se describió por Ljunggren y Kärre en 1986, como la hipótesis de "missing-self" (52,54,56) (Figura 11) y explica el hecho de que las moléculas HLA propias, presentes en la mayoría de las células del organismo, inhiben su destrucción por las células NK. Esta hipótesis se basa en la observación de que las células tumorales, que carecen de moléculas de HLA de clase I, son susceptibles de ser destruidas por las células NK. Esta capacidad de la NK para detectar ligandos ausentes es la razón fundamental para que la alorreactividad se desencadene en sentido injerto contra tumor sin promover EICR, y está respaldado por estudios funcionales *in vitro* (57).

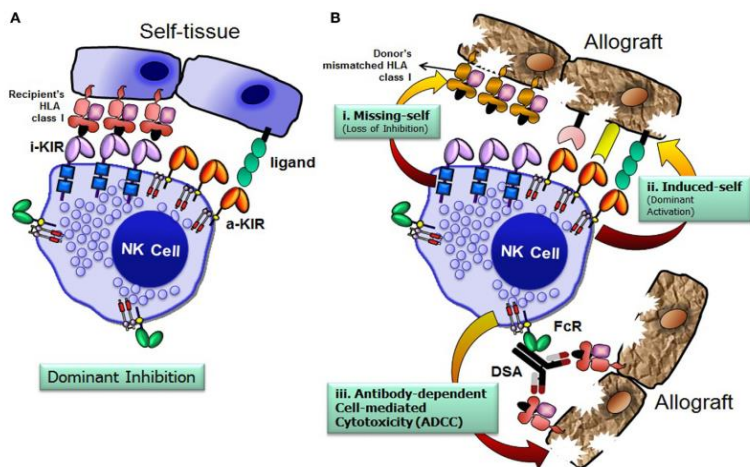


Figura 11. "Pérdida de lo propio" (*missing-self theory*). Fuente: Rajalingam, 2016 (58).

### 1.3.2. Papel de las células NK en el TPH

El inóculo de PH obtenido del donante contiene, además de PH, células inmunitarias, incluyendo NK tanto maduras como inmaduras. Las NK maduras, que provienen del donante, reconocen y destruyen las células tumorales. Además, median la respuesta inmunitaria innata frente a la infección viral o bacteriana. También colaboran con los linfocitos T y B para coordinar la respuesta inmune adaptativa. Asimismo, las células derivadas de los PH del donante pueden adquirir distintos fenotipos NK mediante su maduración en el receptor y pueden participar en la regeneración de tejido como el epitelio (51) (Figura 12).

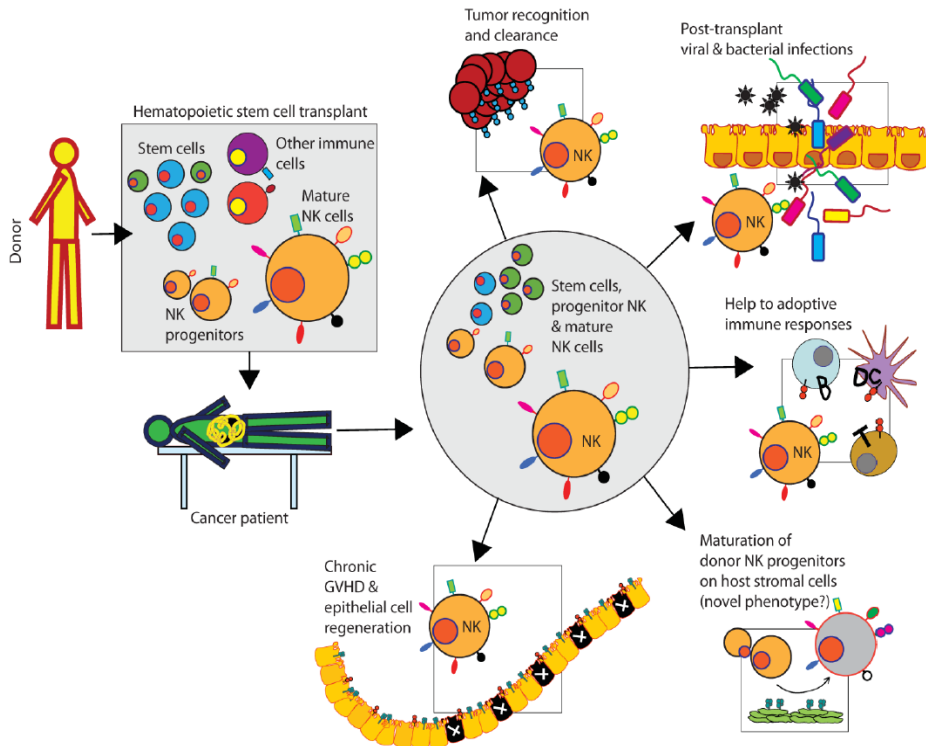


Figura 12. Relevancia de las células NK del donante en el paciente tras TPH.

Fuente: Palmer *et al.*,2013(51).

### 1.3.3. Tipos de receptores de la célula NK

Existen distintas familias de genes que codifican receptores de la célula NK. La mayoría de ellos se expresan de manera estocástica de modo que cada clona de célula NK, dentro de un individuo, puede no expresar el conjunto completo de genes que codifican para los receptores NK presentes en el genoma de ese individuo, sino solo una parte de ellos en una combinación aparentemente aleatoria (6,10). Por ello, hay una heterogeneidad inesperada de subtipos de clonas de células NK con expresión variable de receptores activadores e inhibidores con función distinta, lo que explica la rápida detección de células diana (54). En la tabla 3 se resumen los distintos receptores de NK que se pueden clasificar en función de su capacidad o no para reconocer moléculas del sistema HLA de clase I.

**Tabla 3. Tipos de receptores de la célula NK .**

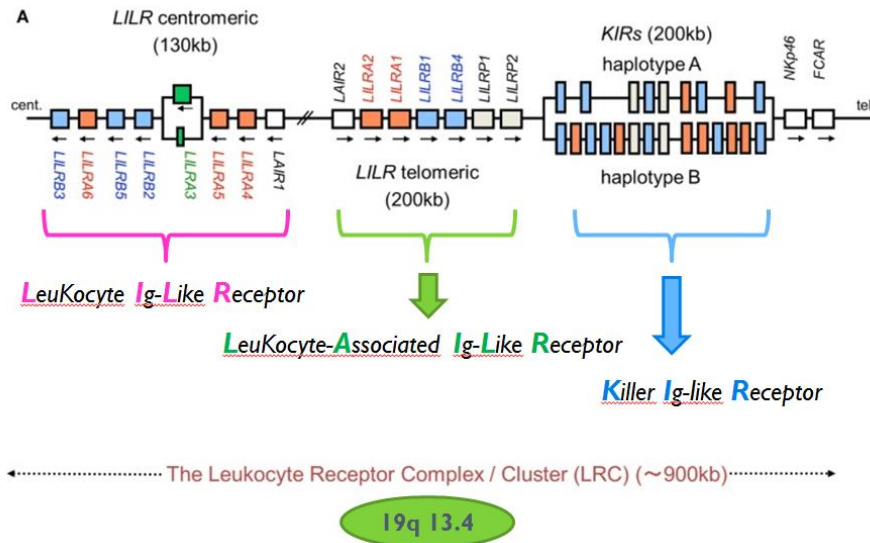
	RECEPTOR DE NK	FUNCIÓN
	<b>Receptores que no reconocen moléculas CMH</b>	
	NCR (NKp30;NKp44; NKp46)	Activación
	FcγRIIIA (CD16)	Activación
	CD244	Inhibición
	CEACAM-1	Inhibición
	<b>Receptores que reconocen moléculas CMH</b>	
<b>Receptores similares a la familia de las inmunoglobulinas</b>	KIR-S	Activación
	KIR-L	Inhibición
	ILT	Activación
		Inhibición
<b>Receptores tipo lectina</b>	NKG2/CD94	Activación (NKG2D*)
		Inhibición (NKG2A)

\*NKG2D: Su ligando es MIC-A

Por su interés biológico solo se detallará lo referente a los receptores KIR (cuyo acrónimo viene del inglés: *Killer cell immunoglobulin-like receptor*)

### 1.3.4. Genes *KIR*

Actualmente la familia de genes *KIR* consiste en 15 genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL2/L3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y dos pseudogenes, *KIR2DP1* y *KIR3DP1* codificados en la región que se denomina *Leukocyte Receptor Complex* (LRC) y se localiza en el cromosoma 19 (19q13.4) (59). En esta región, además de los genes *KIR*, se ubican otros genes que también codifican receptores similares a la familia de las inmunoglobulinas, incluyendo dos *clusters* de *loci* para *LILR* (*LeuKocyte Ig-Like Receptor*) (60) (Figura 13).



**Figura 13. Representación de la región LRC**, donde se ubican los receptores NK de la familia de las inmunoglobulinas. Fuente: Adaptado de Kuroki *et al.*, 2012 (60).

El sistema *KIR* es exclusivo de los primates (61). Los genes *KIR* se expresan en las células NK y en un subtipo de linfocitos T (62–64). La expresión de los genes *KIR* se modula por múltiples factores entre los que se encuentran:

el haplotipo KIR del individuo, las moléculas HLA de clase I circundantes y factores genéticos intrínsecos (51).

Como se ha mencionado anteriormente, a lo largo de la diferenciación de células NK, la expresión de KIR va seguida de un patrón de distribución clonal, que permite el desarrollo de distintos subtipos de células NK, en un mismo individuo, que muestran diferentes combinaciones de KIR (65).

### 1.3.5. Nomenclatura y estructura de los genes *KIR*

La nomenclatura de los genes *KIR* se basa en la estructura de las moléculas que codifica. El primer dígito, que sigue al acrónimo *KIR*, corresponde al número de dominios extracelulares (tipo inmunoglobulina) en la molécula (2D o 3D), y la “D” significa dominio. Esa “D” se sigue o bien de una “L” o una “S”, que indican cola intracitoplasmática “Long=Larga” o “Short=Corta”, respectivamente. En el caso en que la letra “D” vaya seguida de una “P” denota que se trata de un pseudogen (61,66) (Figura 14).

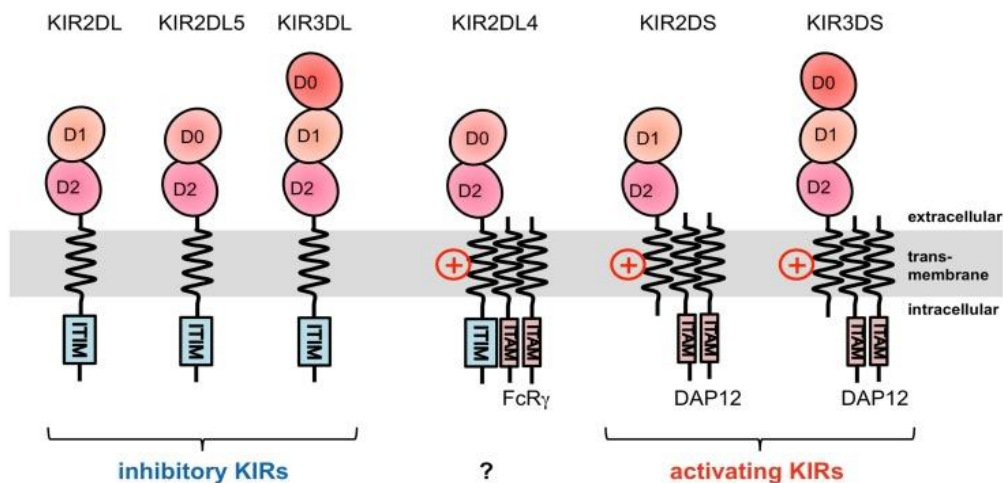


Figura 14. Nomenclatura de los genes *KIR*. Fuente: Kuroki *et al.*, 2012 (60).

Cuando dos o más genes tienen estructura y secuencia muy similar reciben el mismo número pero se diferencian por una letra al final, como ocurre con los genes *KIR2DL5A* y *KIR2DL5B* (67).

### 1.3.6. Proteínas KIR

Las proteínas o receptores KIR con colas intracitoplasmáticas largas generalmente, contienen dos dominios llamados ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motives*) que tienen la propiedad de unirse al dominio SH2 de moléculas señalizadoras, transduciendo señales inhibitorias de la célula NK mediante desfosforilación (66).

Las proteínas KIR con colas intracitoplasmáticas cortas, aportan motivos ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) que para poder transducir señales necesitan acoplarse a dos homodímeros de DAP12 y así señalizar al interior de la célula NK, mediante fosforilación, que se tiene que activar (66) (Figura 15).

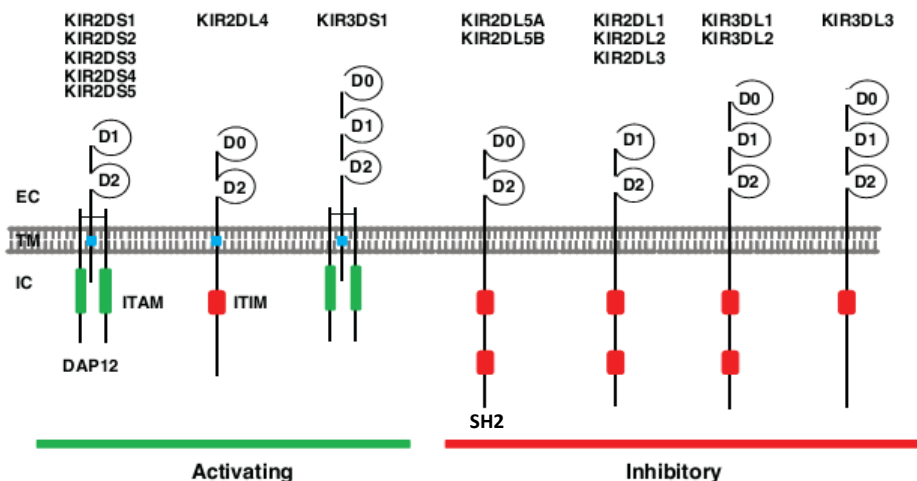


Figura 15. Estructura proteínas KIR. Fuente: Espeli *et al.*, 2010 (68).

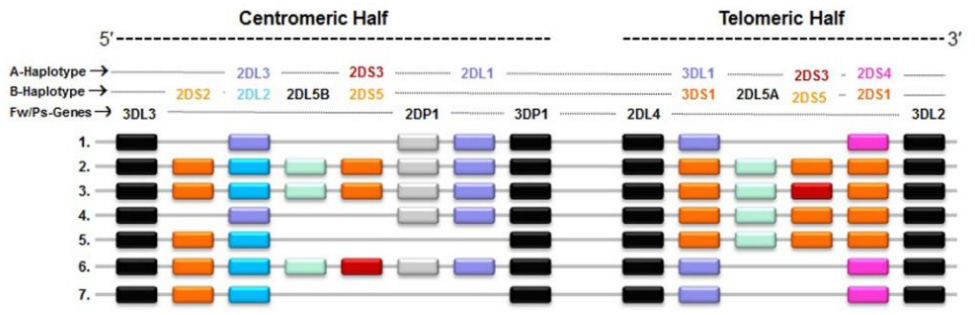
Así que los receptores KIR “L” transducirán señales inhibitorias, mientras que los receptores KIR “S” desencadenarán la activación de la célula NK. Como excepción está el gen *KIR2DL4* que puede ser tanto activador como inhibidor (54).

### **1.3.7. Organización genética del KIR**

Los genes *KIR* se organizan en dos haplotipos, A y B, que pueden tener una amplia variación en el número y tipo de genes *KIR* presentes. Cada haplotipo KIR, bien sea A o B, contiene cuatro genes estructurales (*framework*) (que salvo alguna excepción están conservados en todos los individuos) y delimitan el clúster de genes *KIR*. Este queda flanqueado por *KIR3DL3* a nivel centromérico (extremo 5') y *KIR3DL2* a nivel telomérico (extremo 3') y en la posición central del clúster están los genes *KIR3DP1* y *KIR2DL4* (58,69). Las regiones centrómericas y teloméricas están separadas por una única secuencia llamada sitio de recombinación (RS).

Los haplotipos del grupo B se caracterizan por poseer uno o más de los siguientes genes: *KIR2DL5A/B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1*. Por el contrario, los haplotipos del grupo A se caracterizan por la ausencia de todos esos genes. Por ello, en los haplotipos B predominan genes que codifican KIR activadores mientras que en los haplotipos A prevalecen los genes inhibidores. De hecho en haplotipos de grupo A el único gen de activación posible es *KIR2DS4* mientras que en haplotipos de grupo B puede haber de uno a cinco genes KIR activadores: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1* (54,70) (Figura 16).





**Figura 16. Mapa de haplotipos KIR comunes en poblaciones caucásicas.** Cada rectángulo representa un gen *KIR*. El haplotipo número 1 representa el haplotipo KIR del grupo A y el resto son haplotipos del grupo B. Los genes estructurales aparecen en negro como (Fw); los genes que codifican la activación de KIR están en rosa (específico del haplotipo A) o rojo / naranja (específico del haplotipo B); los genes que codifican receptores inhibidores son morados (si son específicos del haplotipo A) o azules (si son específicos del haplotipo B); y el pseudogen (Ps) *2DP1* está en blanco. Fuente: Rajalingam, 2016(58).

Se ha descrito que las células NK que contienen haplotipos B, al expresar mayor número de genes *KIR* activadores, responden a una mayor variedad de patógenos (54).

### 1.3.8. Polimorfismo de los genes *KIR*

Además de la amplia variación de genes *KIR* en los diferentes haplotipos, todos los genes *KIR* muestran un considerable polimorfismo alélico, de manera que en la actualidad, junio de 2022, hay documentados un total de 1535 alelos codificando 669 proteínas diferentes, según consta en la base de datos IPD-KIR (71).

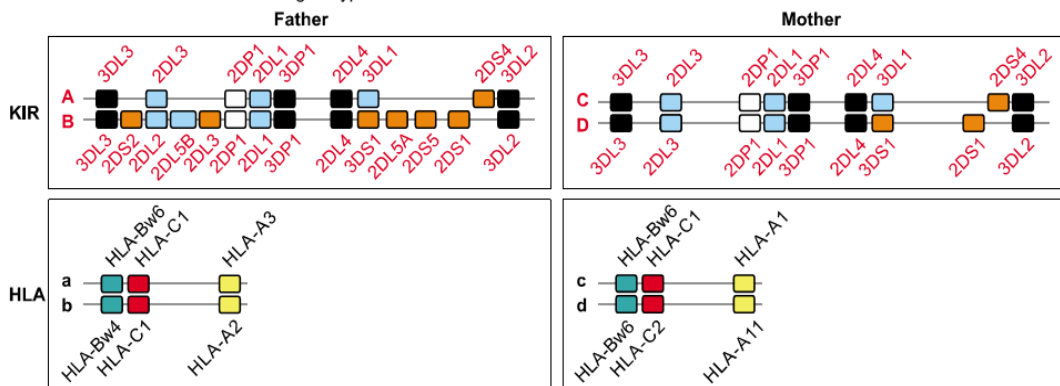
### 1.3.9. Herencia combinada

Debido a la proximidad entre los distintos genes *KIR*, se suelen segregar en haplotipos con alto desequilibrio de ligamiento, que sugiere la presencia de

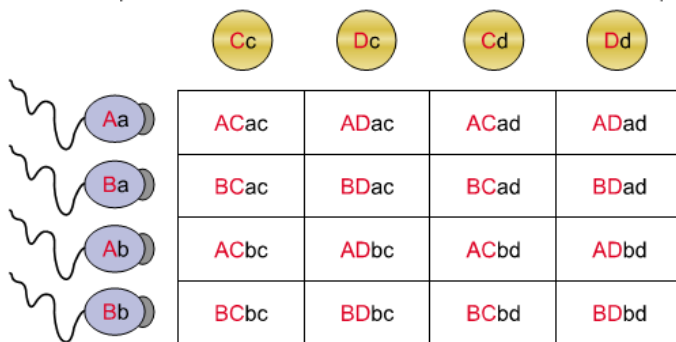
bloques o asociaciones semiconservadas (61). Entre los genes de la región centromérica y entre los que están en la región telomérica el desequilibrio de ligamiento es mayor que entre genes que están en distintas regiones (centrómero vs. telómero) (54).

Los genes *KIR* se segregan independientemente de los genes *HLA*, por lo que compatibilidad HLA no implica necesariamente compatibilidad en KIR (64) (Figura 17). Incluso en el contexto de TPH-HLA idénticos hay altísima probabilidad (aproximadamente un 75%) de hallar incompatibilidad en el contenido de genes *KIR* de esos individuos HLA idénticos (72,73). En trasplantes no emparentados solo el 0,24% de las personas tendrán genes *KIR* coincidentes (51).

I. Parents with distinct KIR and HLA genotypes.



II. Gametes and possible combinations KIR and HLA loci inherited in offspring.



III. Possible combinations of inhibitory KIR-HLA pairs and activating KIRs in a family.

Haplotypes	Inhibitory KIR-HLA combinations		Activating KIRs	
	Number	Type	Number	Type
ABab (Father)	3	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1; 3DL2-A3	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
CDcd (Mother)	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
ACac	2	2DL3-C1; 3DL2-A3	1	2DS4
BCac	2	2DL2/3-C1; 3DL2-A3	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	1	2DS4
BCbc	2	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACac	2	2DL3-C1; 3DL2-A3	1	2DS4
BDac	2	2DL2/3-C1; 3DL2-A3	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ADbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDbc	2	3DL1-Bw4; 2DL3-C1	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ACad	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	1	2DS4
BCad	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ACbd	4	3DL1-Bw4; 2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	1	2DS4
BCbd	4	3DL1-Bw4; 2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	6	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS4; 2DS5; 3DS1
ADad	3	2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDad	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A3/11	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1
ADbd	4	3DL1-Bw4; 2DL3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	3	2DS1; 2DS4; 3DS1
BDbd	3	2DL2/3-C1; 2DL1-C2; 3DL2-A11	5	2DS1; 2DS2; 2DS3; 2DS5; 3DS1

**Figura 17. Herencia genes *KIR* y *HLA*.** Las familias de genes *KIR* y *HLA* están desvinculadas y ubicadas en diferentes cromosomas humanos, 19 y 6, respectivamente. El panel I ilustra la variación entre los haplotipos *KIR* y sus ligandos *HLA* de los progenitores. El panel II representa los cuatro tipos posibles de gametos, de cada progenitor, clasificados con distintas combinaciones de un haplotipo *KIR* y un haplotipo *HLA*. Las asociaciones aleatorias de gametos forman cigotos que llevan una de las 16 combinaciones posibles de haplotipos maternos y paternos para *KIR* y ligandos *HLA*, generando una gran diversidad en el número y tipo de combinaciones de *KIR*-*HLA* entre los progenitores y su descendencia (Panel III). Fuente: Rajalingam, 2011(54).

El genotipo del individuo se puede catalogar como AA o Bx. La “x” puede ser un haplotipo tanto A como B. Esto se debe a la dificultad, en ausencia de estudios familiares, de distinguir en presencia de un haplotipo B si el otro haplotipo es A o B (74).

### 1.3.10. Ligandos *HLA* para los receptores *KIR*

Los ligandos de *KIR* con mayor afinidad son las moléculas *HLA* de clase I, particularmente la región  $\alpha 1/\alpha 2$ , por lo que estas moléculas son las más importantes en el reconocimiento como ligandos de los genes *KIR* en el siguiente orden de importancia *HLA*-C, *HLA*-B y *HLA*-A (61,75).

La especificidad de la interacción KIR-HLA puede influirse por la existencia de ciertos aminoácidos en posiciones específicas. De este modo, algunas especificidades de KIR inhibitorias reconocen de manera preferencial los aminoácidos<sup>1</sup> Lys o Arg en la posición 80 de los ligandos HLA-C (61). Las moléculas HLA-C se han clasificado en dos grupos con base en dimorfismos en el dominio  $\alpha 1$  de la cadena pesada. La presencia de Ser en la posición 77 y Asn en la posición 80 determinan al grupo C1 y la presencia de Asn en la posición 77 y Lys en la posición 80 determinan al grupo C2. Las moléculas KIR2DL1 y KIR2DS1 interactúan con alotipos HLA-C de grupo C2 (tales como *-C\*02*, *-C\*04*, *-C\*05*, *-C\*06*, *-C\*12:04*, *-C\*15*, *-C\*16:02*, *-C\*17* y *-C\*18*), mientras que moléculas como KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DS2 interactúan con alotipos del grupo C1 (entre los cuales se encuentran *-C\*01*, *-C\*03*, *-C\*07*, *-C\*12:02*, *-C\*12:03*, *C\*16:01*)(61,76–78) (Figura 18). La posición 44 del dominio 1 del KIR es fundamental para determinar su habilidad para discriminar entre los dos alotipos HLA-C descritos (76).

---

<sup>1</sup> Nota: Lys (lisina); Arg (arginina); Ser (serina) y Asn (asparagina).

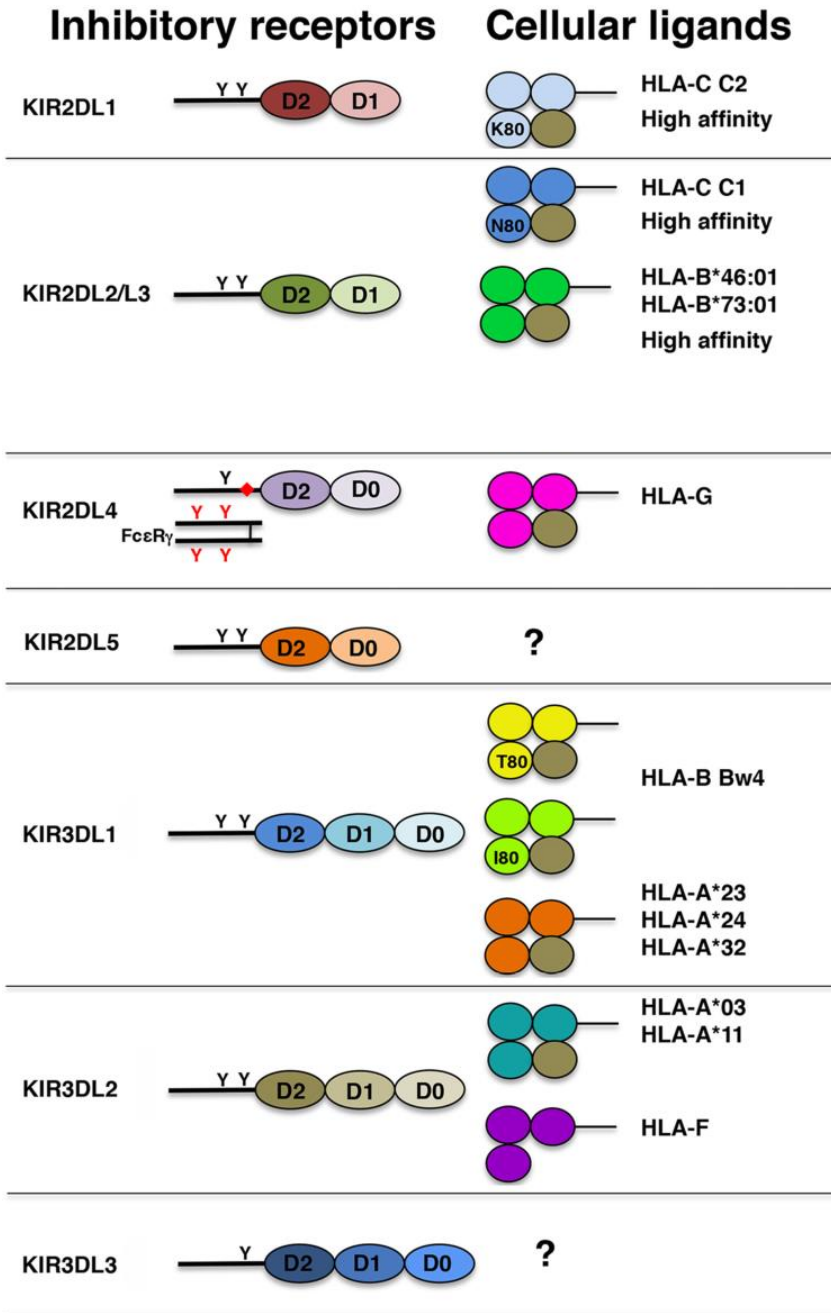
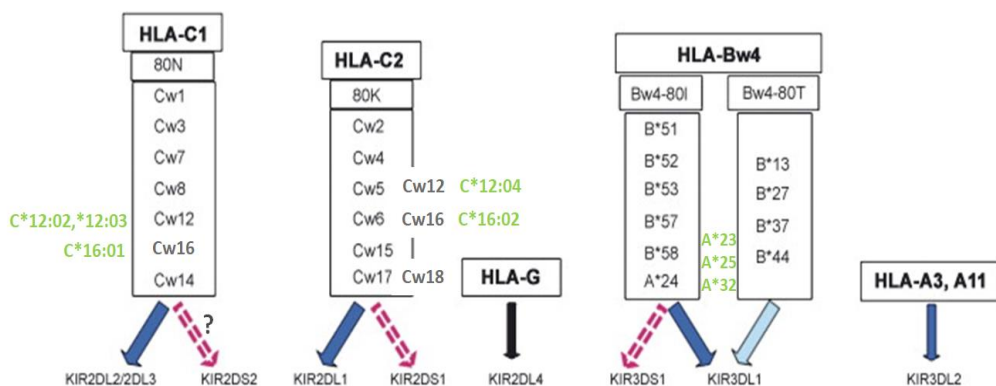


Figura 18: Estructura de los KIR inhibitorios y sus ligandos HLA de clase I. Fuente: Pende *et al.*, 2019 (79).

Los alotipos de los *loci* *HLA-A* y/o *HLA-B* que conlleven un motivo *Bw4* (determinado por la presencia de los aminoácidos<sup>2</sup> N, D o S en el residuo 77 y IALR, TLLR, o TALR en los residuos 80-83) son reconocidos por el receptor *KIR3DL1* que se une con alelos *HLA-Bw4* (80–83). De los cinco residuos de la hélice alfa 1 que determinan el dominio *Bw4*, el dimorfismo Ile/Thr en el residuo 80 es el marcador que define la afinidad de unión por *KIR3DL1*. Entre los alotipos *HLA-A Bw4* positivos que son ligandos de *KIR3DL1* se encuentran *A\*24:02*, *\*23:01* y *\*32:01* (79). La presencia del epítipo *HLA-Bw4* en un alelo del *locus HLA-B* conlleva señal inhibitoria mayor, que resulta en mejor protección frente a la citólisis de la célula NK, que si se presenta en un alelo *HLA-A* (74).

*KIR3DL2* se une a dos alotipos *HLA-A*, *A\*03* y *A\*11*, aunque este receptor se caracteriza por su baja capacidad inhibitoria y su interacción con el ligando es altamente dependiente del péptido unido a *HLA-A* (79) (Figura 19).



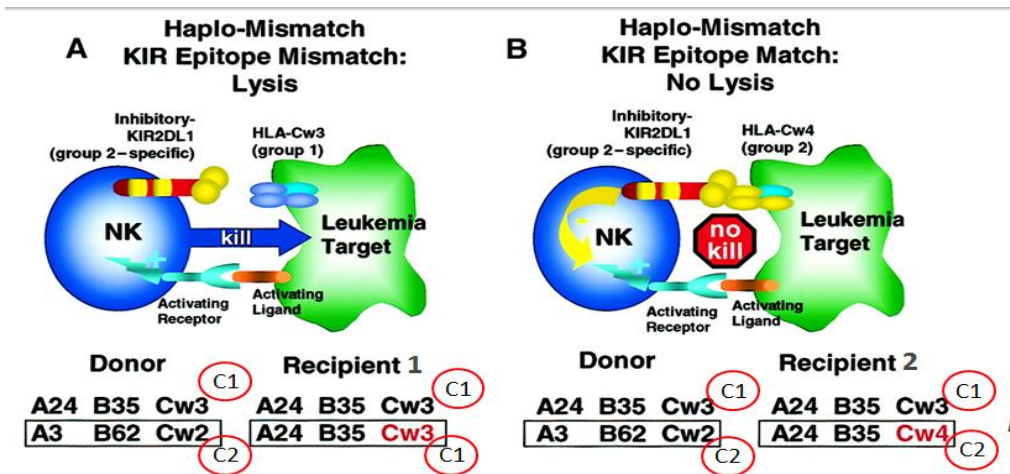
**Figura 19. Interacciones HLA-KIR.** Fuente: Adaptado de Sabouri Ghannad *et al.*, 2014 (78).

<sup>2</sup> Nota: N, Asn (asparagina); D, Asp (ácido aspártico); S, Ser (serina); I, Ile (isoleucina); A, Ala (alanina); L, Leu (leucina); R, Arg (arginina); T, Thr (treonina).

### 1.3.11. Modelos de predicción de alorreactividad

Existen diferentes modelos para definir la alorreactividad potencial de las células NK.

El **modelo Perugia** o **incompatibilidad ligando-ligando** se basa en la incompatibilidad de los ligandos de los receptores KIR (HLA) entre donante y paciente (39) y deriva de la clásica hipótesis de “*missing-self*” explicada anteriormente (Figuras 11, 20 y 21). Este modelo predice alorreactividad en dirección *GvH* si las células NK del donante poseen ligandos KIR ausentes en el receptor (C2, C1, *Bw4* o *A3/A11*) (50,84,85). La predicción de alorreactividad según este modelo precisa el tipaje HLA de clase I (*C*, *B* y *A*) en el donante y en el paciente (39). En este modelo se asume que si un individuo expresa un ligando, posee también el receptor para ese ligando (86).

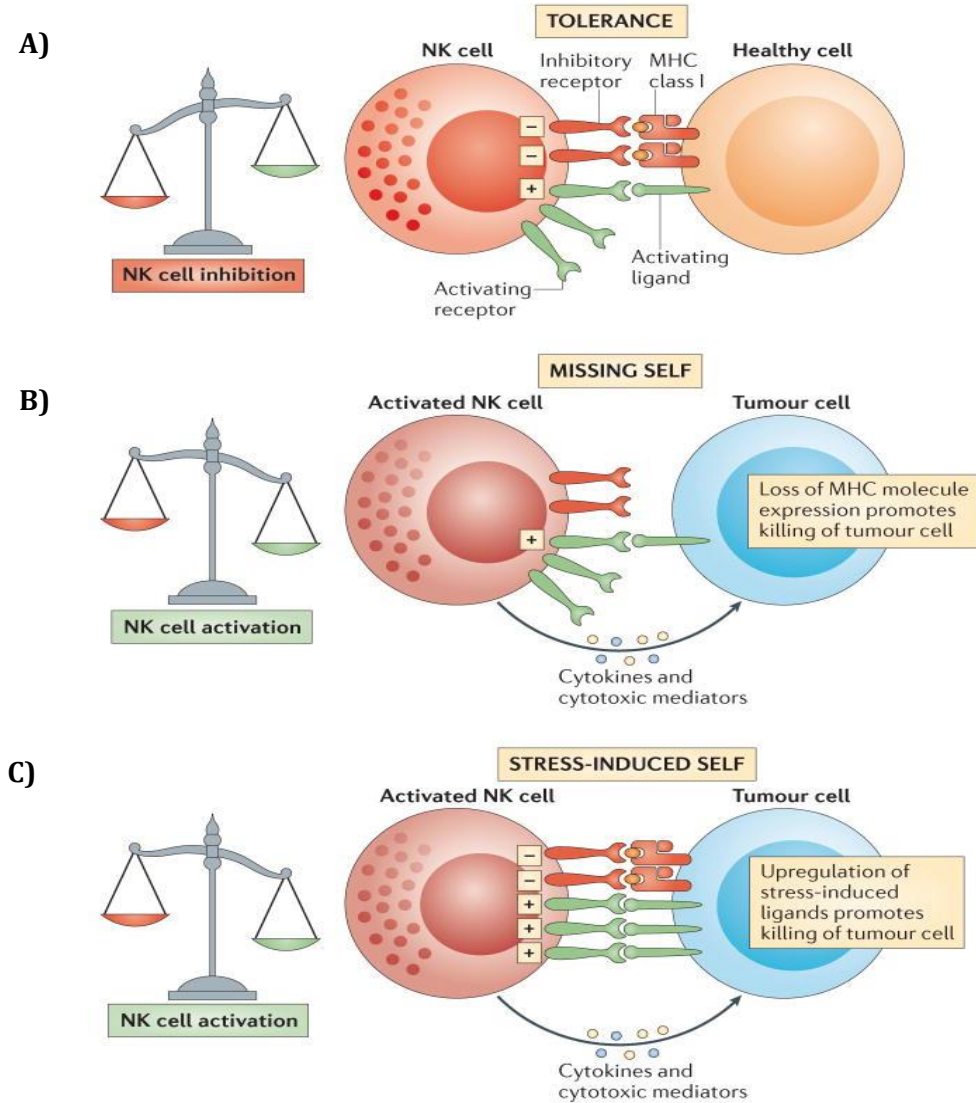


**Figura 20. Incompatibilidad ligando-ligando.** La alorreactividad NK induce potente efecto injerto contra tumor. Panel A: Cuando hay disparidad en ligandos KIR, el receptor de activación se une al correspondiente ligando de activación y dispara la citotoxicidad mediada por NK (Cw3 pertenece al grupo C1 y Cw2 al grupo C2). Panel B: Cuando hay compatibilidad en ligandos KIR la inhibición de la lisis domina a la activación (Cw2 y Cw4 pertenecen al mismo grupo C2). Fuente: Adaptado de Farag *et al.*,2002(84).

Por tanto, un donante tendrá potencial alorreactividad NK si es heterocigoto para los ligandos HLA-C (C1/C2) frente a pacientes homocigotos en estos ligandos (C1/C1 o C2/C2). También serán donantes potencialmente alorreactivos aquellos que expresen epítomos *HLA-Bw4* y/o *HLA-A3/A11* si el paciente no presenta estos ligandos (es decir, si es *Bw4* y/o *A3/A11* negativo, respectivamente). Además, las células NK del donante tienen que estar licenciadas para ser funcionales, es decir, en el donante debe estar expresado el KIR y su ligando para que sus células NK tengan capacidad efectora (64).

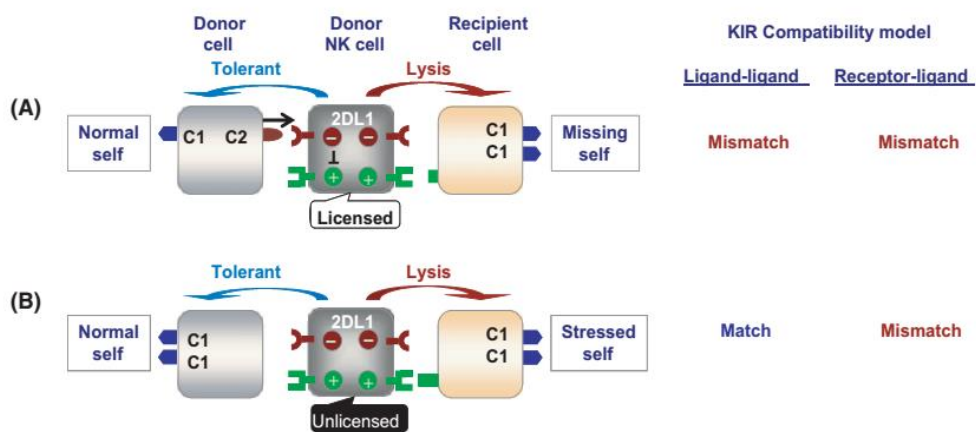
El proceso por el cual la célula NK es capaz de adquirir la competencia necesaria para reconocer lo extraño y eliminar las células infectadas o tumorales se denomina de forma genérica “educación” o “licencia”. Aunque en ocasiones se utilizan como sinónimos, de forma clásica se ha reservado el término de “educación de la célula NK” para describir todos los cambios funcionales y fenotípicos inducidos en la célula NK durante su desarrollo en la médula ósea, por la expresión de las moléculas propias HLA de clase I. El término “licencia” denota un mecanismo activo por el que las células NK maduras adquieren una determinada capacidad de respuesta durante el contacto con la célula con la que interactúa en función del equilibrio/desequilibrio entre las señales activadoras que reciba y el grado de inhibición provocado por la interacción entre sus receptores KIR y los ligandos HLA-I de la célula diana (87,88) (Figura 21).





**Figura 21. Reconocimiento de las células tumorales por parte de las NK.** **A)** Las células NK son tolerantes a las células propias “normales” ya que las señales de activación quedan amortiguadas por la participación de los receptores inhibitorios, cuya función domina sobre la de los activadores. **C)** Las células NK se activan selectivamente por células sometidas a “estrés” que expresan una densidad de ligandos de superficie celular para activar receptores que supera la señalización a través de receptores inhibitorios. **B)** esta activación de las células NK conduce a la eliminación del tumor directamente (citotoxicidad) o indirectamente (producción de citoquinas como IFN- $\gamma$ ). Fuente: Adaptado de Vivier *et al.*, 2012 (88).

El **modelo Memphis** o **incompatibilidad receptor-ligando** se basa en la incompatibilidad entre el receptor KIR del donante y el ligando KIR del paciente y predice alorreactividad si el donante tiene un receptor KIR para el que su ligando afín está ausente en el paciente (hipótesis del “*missing-ligand*”) (50). La predicción de alorreactividad según este modelo precisa el genotipo *KIR* del donante y el tipaje *HLA* de clase I del paciente (50,89) (Figura 22).



**Figura 22. Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis) frente a incompatibilidad ligando-ligando (Perugia).** Panel A) Una célula NK de donante que expresa *KIR2DL1* es "educada" o "autorizada" por el ligando donante HLA-CLys80 (C2) (mostrado como flecha recta). Esta célula del donante es tolerante a sí misma, pero puede matar células del paciente porque C2 está ausente en él (*“missing-self” recognition*). La ausencia de reconocimiento de lo propio, por sí sola, no es suficiente para activar las células NK, ya que muchas células receptoras sin ligando no se lisan, incluidas las de la leucemia linfoblástica del adulto, los glóbulos rojos y las células no hematopoyéticas. Panel B) Una célula NK de donante que expresa *KIR2DL1* no tiene licencia porque el donante no posee el ligando HLA-CLys80 (C2). Esta célula del donante es tolerante a sí misma, pero podría matar a la célula leucémica del receptor por un proceso de regulación positiva mediado por el ligando activador (reconocimiento de "auto-estrés"), un concepto fundamental del modelo de incompatibilidad de ligando-receptor de Memphis. Fuente: Leung, 2011(50).

El modelo Memphis se basa en la observación de que no todos los genes de los receptores KIR están presentes en el genoma de todos los individuos y, además, puede haber expresión diferente en la superficie de las células NK. A diferencia del modelo anterior, no se deduce la presencia del KIR en función del ligando expresado, si no que se busca directamente.

El **modelo de ausencia de ligando-KIR en el receptor** está definido por la expresión de C2 y/o C1, y/o Bw4 en el paciente y predice la alorreactividad por el número de ligandos KIR ausentes en el paciente, asumiendo que las células NK de la mayoría de donantes expresarán los KIR inhibidores específicos para C2, C1, Bw4 basado en la alta frecuencia de estos en la población. Este modelo precisa únicamente el tipaje *HLA* (en resolución intermedia o alta resolución) de clase I del paciente (90,91). Es similar al modelo receptor-ligando pero se diferencia porque en este modelo no se tienen en cuenta ninguno de los tipajes *HLA/KIR* del donante (92) (Figura 23).

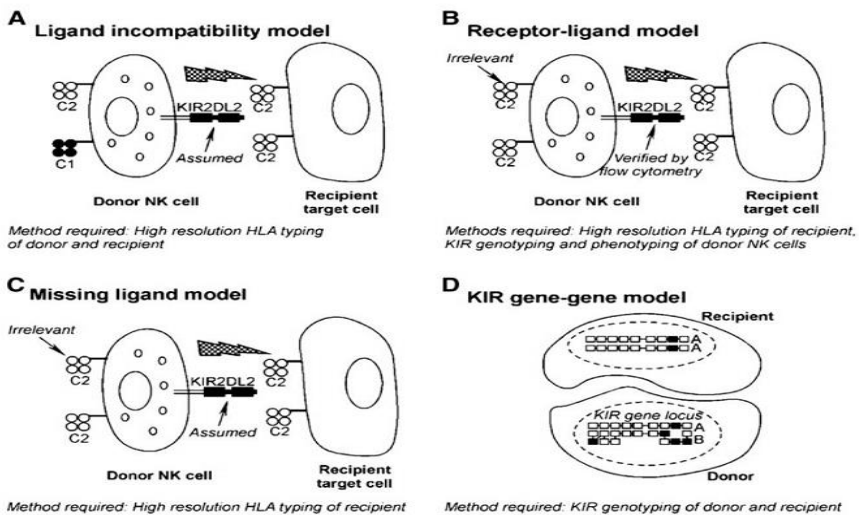


Figura 23. Ausencia de ligando KIR (panel C) y comparativa con el resto de modelos. Fuente: Symons *et al.*,2010 (64).

El **modelo Nantes** o **incompatibilidad KIR-KIR ( gen-gen)** (93) se basa en la incompatibilidad entre el receptor KIR del donante y el receptor KIR del paciente y predice la alorreactividad si el donante tiene un receptor KIR ausente en el paciente (incompatibilidad receptor-receptor o gen-gen). Una incompatibilidad *iKIR* gen-gen se define como un gen *KIR* inhibidor presente en el donante pero ausente en su receptor o viceversa (incompatibilidad *GvH* o *HvG*, respectivamente) (64).

El modelo de incompatibilidad *KIR* gen-gen, es la base para el actual **modelo del haplotipo KIR** propuesto por el grupo de **Stanford** y precisa el genotipo *KIR* tanto en el donante como en el paciente. El modelo de haplotipo *KIR* en el donante se basa en el fundamento de que cuantos más genes activadores estén presentes en el donante, mayor potencial de alorreactividad. El haplotipo *KIR* "A" tiene solo un gen de activación (*KIR2DS4*), mientras que el haplotipo *KIR* "B" tiene más, incluyendo *KIR2DS1* y *KIR2DS2*. Puesto que el haplotipo *KIR* B lleva más genes de activación, en el contexto de haplo-TPH supuestamente a partir de donantes con haplotipo *KIR*-B, implicarán una alorreactividad NK más marcada (50).

Los genotipos para las partes centromérica (Cen) y telomérica (Tel) del *locus KIR* se asignan en función de la presencia o ausencia de uno o más genes *KIR* que definen el haplotipo B. De este modo Cen-A1 y Tel-A1 son el patrón de genes *KIR* centroméricos y teloméricos respectivamente, del haplotipo *KIR*-A; Cen-B1 y Cen-B2 son genes *KIR* centroméricos de los haplotipos-B, y Tel-B1 es el patrón de genes *KIR* a nivel de telómero común de los haplotipos-B (49) (Figura 24, 25).

Haplotype	Cen motif	Centromeric part									RS	Telomeric part					Tel motif				
		3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1		2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3/5		2DS1	2DS4	3DL2	
A	Cen-A1																				Tel-A1
	Cen-A1																				
B	Cen-B1																				Tel-A1
	Cen-B2																				Tel-A1
	Cen-B1																				Tel-B1
	Cen-B2																				Tel-B1

**Figura 24. Modelo de haplotipo KIR.** Los genes estructurales están sombreados en gris, los genes exclusivos del haplotipo B son azules y los genes del haplotipo A se representan en rojo. Fuente: Cooley et al., 2010 (49).

Cen-B1 y Cen-B2 se agrupan como Cen-B, mientras que Cen-A1 se abrevia a Cen-A y, del mismo modo, Tel-A1 a Tel-A (49) (Figura 24).

Centromeric (2DS2, 2DL2, 2DL3)	
Cen-A/A	2DL3 only
Cen-A/B	2DL3 with 2DS2 and/or 2DL2
Cen-B/B	2DS2 and/or 2DL2; no 2DL3
Telomeric (3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)	
Tel-A/A	3DL1 and 2DS4 only
Tel-A/B	3DL1 and 2DS4 with 3DS1 and/or 2DS1
Tel-B/B	lacking 3DL1 and/or 2DS4

**Figura 25. Grupos asignados en función de los genes KIR centroméricos y teloméricos.** Fuente: Cooley et al., 2010 (49).

Finalmente el modelo del haplotipo KIR clasifica a donantes y receptores en función de uno de los dos genotipos KIR: AA cuando el individuo es homocigoto y sus dos haplotipos son del grupo A; o Bx cuando su genotipo KIR está compuesto por una de las combinaciones indicadas en la figura 24 (64,74).

La puntuación del contenido genes *KIR-B* (*B-content score*) se define como el número de genes B centroméricos y teloméricos que definen el haplotipo B. Esta puntuación por tanto puede ir de 0-4 (49) (Figura 26).

Donor KIR Genotype	B content score	Cen	Tel
A/A	0	A/A	A/A
B/x	1	A/A	A/B
		A/B	A/A
	2	A/A	B/B
		A/B	A/B
		B/B	A/A
		B/B	A/B
	3	A/B	B/B
		B/B	A/B
4	B/B	B/B	

**Figura 26. B-content score.** La puntuación del contenido KIR-B se calcula sumando el número de dominios Cen-B y Tel-B en cada genotipo. Fuente: Cooley *et al.*, 2010 (49).

En función de estos resultados se clasifica como “neutro” (*neutral*), cuando no hay ninguno, o solo un haplotipo, que contiene genes KIR-B; “favorable” (*better*), cuando hay dos o más genes KIR-B siempre que no se encuentren los dos en centrómero; “óptimo” (*best*) cuando hay dos o más genes KIR-B y al menos dos están a nivel centromérico (94) (Figura 27).

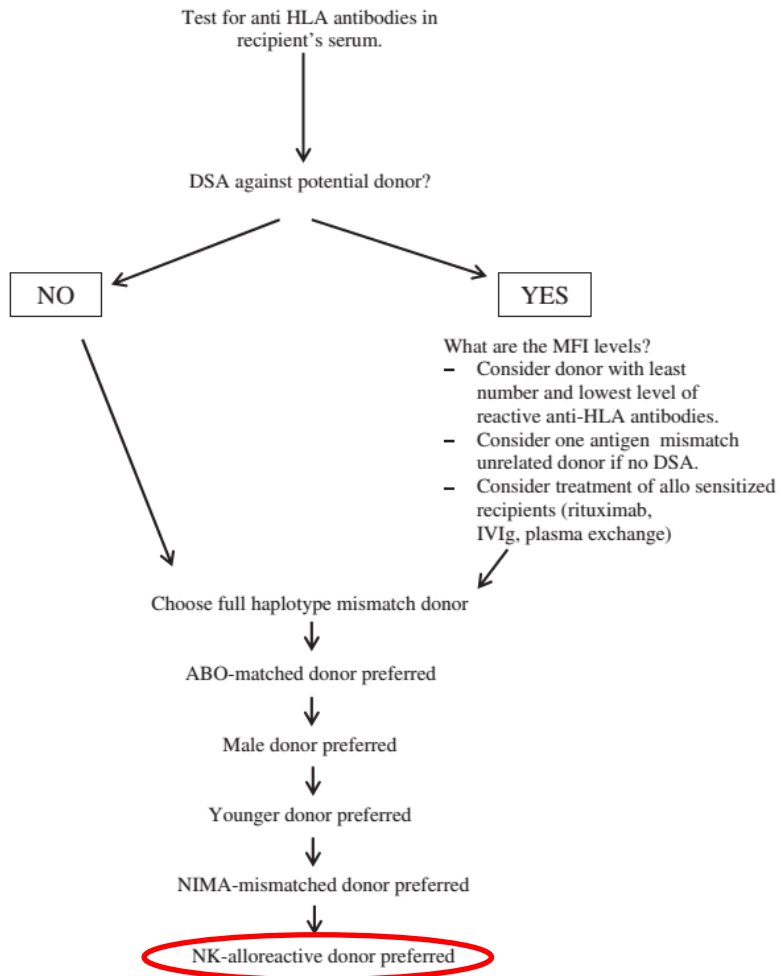
KIR Genotype	KIR B Motif Content	Centromeric Haplotypes	Telomeric Haplotypes		KIR Donor Group <sup>a</sup>
A/A	0	A/A	A/A	Neutral	KIR-Neutral (zero or one B motif)
B/x	1	A/A	A/B	Neutral	KIR-Neutral (zero or one B motif)
B/x	1	A/B	A/A	Neutral	KIR-Neutral (zero or one B motif)
B/x	2	A/A	B/B	Better	KIR-Better/Best (two or more B motifs)
B/x	2	A/B	A/B	Better	KIR-Better/Best (two or more B motifs)
B/x	2	B/B	A/A	Best	KIR-Better/Best (two or more B motifs)
B/x	3	A/B	B/B	Better	KIR-Better/Best (two or more B motifs)
B/x	3	B/B	A/B	Best	KIR-Better/Best (two or more B motifs)
B/x	4	B/B	B/B	Best	KIR-Better/Best (two or more B motifs)

<sup>a</sup>Better KIR donors have two or more B motifs without Cen-B/B, and Best KIR donors have two or more B motifs with Cen-B/B.

**Figura 27. Donante neutro, favorable y óptimo.** Fuente: Mehta y Oran, 2019(94).

Por tanto, hay distintos modos de predecir el grado de alorreactividad KIR entre donante y receptor, pero se desconoce cuál es el mejor modelo en cada tipo de trasplante. Además, en el contexto del haplo-TPH no manipulado, sin eliminación de células T del injerto, con CFM-post, no hay evidencia unánime sobre el nivel en el que se debe considerar la alorreactividad NK dentro del algoritmo de selección del mejor donante. Algunos centros, con gran experiencia en este tipo de plataforma, consideran la alorreactividad NK como

el último aspecto a valorar (95) (Figura 28). Este aspecto puede ser muy relevante ya que con frecuencia un paciente dispone de varios potenciales donantes haploidénticos (2,7 potenciales donantes por paciente) según la experiencia de la Johns Hopkins University (96,97) centro pionero en la utilización de esta modalidad de TPH.



**Figura 28. Algoritmo de selección de donante haploidéntico.** DSA significa *donor-specific anti-HLA antibodies* (anticuerpo anti-HLA donante específico, ADE); MFI, *median fluorescence intensity* (intensidad de fluorescencia media, IFM); NIMA, *non-inherited maternal antigens* (antígenos maternos no heredados). Fuente: Ciurea y Champlin, 2013 (95).





# **Hipótesis y objetivos**



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A tenor de los estudios publicados hasta la fecha, la alorreactividad NK entre donante y receptor podría explicar, en parte, una reducción de la recaída, una disminución de la MNRR y una mayor SG en pacientes con hemopatías malignas que reciban un haplo-TPH. La utilización de diferentes modelos para determinar la potencial alorreactividad KIR entre donante y receptor podría ayudar a diferenciar, con mayor exactitud, el impacto de la misma en los resultados y, por ende, permitiría aportar información relevante en cuanto a qué metodología es la más adecuada para la selección del mejor donante para el haplo-TPH y/o la inmunoterapia celular en enfermedades neoplásicas en un futuro. Entre estos modelos se incluyen: la incompatibilidad ligando-ligando (Perugia); incompatibilidad receptor-ligando (Memphis); incompatibilidad *KIR* gen-gen (Nantes); modelo de haplotipo KIR-B (Stanford) y ausencia de ligando KIR en el receptor.

### **OBJETIVOS:**

**Objetivo principal:** Determinar si la alorreactividad NK tiene impacto en los principales eventos clínicos de interés en receptores de haplo-TPH, estableciendo, a su vez, entre los diferentes modelos de predicción utilizados, el que aporte mayor información, capacidad predictiva y, por tanto, ayude en la selección del donante más idóneo.

### **Objetivos secundarios:**

1. Estudiar criterios clínicos generales del donante, del receptor y la hemopatía de base, así como estudios inmunológicos sobre la compatibilidad HLA que puedan influir en los resultados de este tipo de trasplante.

2. Establecer la distribución de frecuencias de los alelos HLA, en la cohorte de pacientes, determinando los más prevalentes (con frecuencias superiores al 5%) y las asociaciones HLA de clase I y II más comunes.

3. Conocer la distribución de frecuencias del sistema KIR en los pacientes.

4. Describir la existencia de potencial alorreactividad NK en las parejas D/R en función de los diferentes modelos de predicción estudiados.

5. Analizar el efecto de la alorreactividad NK en el subgrupo de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA).

### **Justificación de los objetivos:**

El haplo-TPH aumenta de forma notable la probabilidad de disponer de un donante. Sin embargo, en la literatura, no existe un criterio unánime para seleccionar el donante haploidéntico más adecuado.

La CFM-post haplo-TPH como profilaxis de la EICR se ha demostrado eficaz. Su acción incluye la destrucción de células T del donante en fase de proliferación tras el reconocimiento antigénico de la disparidad HLA, permitiendo preservar las células T no reactivas. Por ello, el haplo-TPH sin depleción T basado en la CFM-post se considera un modelo útil para el estudio de la alorreactividad NK ya que, tanto la posible menor incidencia de EICR como la posible menor participación de otros subtipos de linfocitos, podría hacer más efectivo y visible el papel que juega la alorreactividad NK.

## **Material y métodos**



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio clínico prospectivo de cohortes observacional multicéntrico con financiación FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) concedido por el Instituto de Salud Carlos III. Su número de expediente: PI15/01396; CIF: G96886080. Fecha de concesión 14/07/2015 (Anexo I).

El Dr. Carlos Solano fue el investigador principal del proyecto FIS y tanto la Dra. Dolores Planelles como el Dr. José Luis Piñana fueron investigadores colaboradores en la misma. La doctoranda se incorporó desde el primer momento como responsable de centralizar, recoger, tabular, analizar los datos e interpretar sus resultados.

### 3.1. LA COHORTE DEL ESTUDIO

#### 3.1.1. Pacientes.

##### 3.1.1.1. Número de casos.

Se incluyeron en el estudio 119 pacientes adultos con patología hematológica maligna en los que se realizó un trasplante HLA genótipicamente haploidéntico con donante familiar, utilizando PH no manipulados y profilaxis con CFM-post entre 2015 y 2020 en cinco centros españoles: Hospital Clínico Universitario de Valencia (n=31); Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (n=38); Hospital Clínico Universitario de Salamanca (n=17); Hospital Carlos Haya de Málaga (n=19) y Hospital Universitario Son Espases de Palma de Mallorca (n=14).

##### 3.1.1.2. Criterios de inclusión

Los criterios de elegibilidad para la inclusión en el estudio fueron: (1) edad mayor o igual a 18 años. (2) Enfermedad hematológica de base: LA, SMD-

AR, SLP, mieloma múltiple (MM) y neoplasia mieloproliferativa crónica (NMPC). (3) Situación de enfermedad al TPH: a) En el caso de LA: haber alcanzado situación de primera, o posterior, remisión completa ( $\geq 1^{\text{a}}$  RC); b) SMD-AR: cifra de blastos en MO inferior al 10%; c) SLP: RC o remisión parcial (RP); d) MM: en RC o RP; e) NMPC: en cualquier situación salvo fase acelerada. El acondicionamiento mieloablativo (MA) se utilizó en pacientes jóvenes (<55 años) con LA y SMD-AR, mientras que el acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) se utilizó para pacientes mayores ( $\geq 55$  años) y en pacientes con SLP/NMPC y MM.

### **3.1.1.3. Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión fueron edad pediátrica (<18 años), hemopatías no malignas (aplasia medular, hemoglobinopatías) y que el paciente no hubiera consentido su participación en el estudio.

Los pacientes excluidos del estudio fueron: 2-05; 2-15; 2-31; 4-15; 6-03 y 6-14. Por tanto la N resultante fue de 113 pacientes. A continuación se enumeran los motivos de exclusión de cada uno:

- El paciente 2-05 fue un registro duplicado del 2-18.
- El paciente 2-15 se incluyó pero el donante se negó a participar en el estudio.
- El paciente 2-31 fue *exitus* pre-TPH.
- En los pacientes 04-15 y 6-14 faltó información clínica necesaria.
- En el paciente 06-03 hubo problema con la muestra de EDTA del donante que no estaba disponible.



#### **3.1.1.4. Consentimiento informado del receptor**

A cada paciente se le entregó, en la consulta pretrasplante, una hoja informativa describiendo los objetivos del estudio, las muestras necesarias para realizarlo, así como el tiempo de seguimiento (Anexo II). Para la inclusión, era imprescindible la firma del consentimiento informado por parte del paciente, de acuerdo a las normas éticas requeridas por la declaración de Helsinki (Anexo III).

#### **3.1.2. Donantes**

##### **3.1.2.1. Número de casos.**

Se incluyeron, en el estudio, 116 DE sanos HLA genotípicamente haploidénticos a su familiar paciente con la patología hematológica maligna que indicaba el TPH y que reunieron los criterios establecidos en la inclusión de paciente.

La procedencia de los donantes fue: Hospital Clínico Universitario de Valencia (n=31), Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (n=36), Hospital Clínico Universitario de Salamanca (n=17), Hospital Carlos Haya de Málaga (n=19), Hospital Universitario Son Espases de Palma de Mallorca (n=13).

La discrepancia entre el número de donantes de Hospital Universitario Politécnico La Fe y el de pacientes, se debe a la negativa a participar en el estudio de uno de los donantes (donante correspondiente a receptor 2-15) y que el donante 2-05 fue un registro duplicado del 2-18. Asimismo, respecto al Hospital Universitario Son Espases, del donante 06-03 la muestra de EDTA no estuvo disponible y esto llevó a excluir esta pareja D/R.

### **3.1.2.2. Criterios de inclusión**

Cada donante seleccionado debía reunir tres criterios: 1) compartir un haplotipo HLA completo con el paciente; 2) cumplir los criterios habituales de elegibilidad de donante sano para movilización con G-CSF y recolección de PH de SP o de recolección de MO y 3) no expresar antígenos HLA del haplotipo no compartido para los que el receptor hubiera desarrollado aloinmunización específica, es decir, que existieran anticuerpos anti-HLA donante específicos (ADE).

Como fuente de PH se aceptó el empleo de SP o MO. El recuento recomendado de PH dependió de la fuente a utilizar. En caso de emplear la SP el recuento fue:  $4-6 \times 10^6$  CD34+ /Kg de peso del receptor y, para MO, fue de:  $2 \times 10^6$  células mononucleadas /Kg de peso del receptor.

En caso de disponer de varios donantes haploidénticos, la elección del mejor donante haploidéntico disponible se realizó de forma centralizada teniendo en cuenta los siguientes criterios (por orden de prioridad): donante varón; joven; incompatibilidad completa del haplotipo no compartido (5/10); mismo estado serológico D/R frente al citomegalovirus (CMV); sin incompatibilidad mayor de grupo sanguíneo ABO entre D/R.

### **3.1.2.3. Consentimiento informado donante**

Se le entregó, en la consulta premovilización/extracción de PH, una hoja informativa (Anexo IV). A continuación, si el donante estaba de acuerdo, se procedía a la firma del consentimiento informado que fue redactado según las normas éticas requeridas por la declaración de Helsinki (Anexo V).

### 3.2. COMITÉ DE ÉTICA Y COMITÉ CIENTÍFICO

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del instituto de investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia (INCLIVA) (Anexo VI). Cada centro participante obtuvo la aceptación de su CEIC antes de iniciar el reclutamiento. Asimismo, se han seguido los principios éticos generales de la declaración de Helsinki y las normas éticas de APA (*American Psychological Association*). Además, el proyecto se sometió a la evaluación, y conformidad, por parte del Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia-INCLIVA (Anexo VII).

### 3.3. VARIABLES REGISTRADAS, DEFINICIÓN Y OBTENCIÓN

En este apartado se detallan las distintas variables recogidas. Todas siguen un mismo esquema. En primer lugar, el título que centra la materia sobre la que van a versar las variables. De aquellas que lo requieren se incluye, además, la definición y las herramientas utilizadas para obtener la información. Por último, se especifica la parametrización de cada variable.

#### 3.3.1. Relacionadas con el receptor

##### *Variables*

- ID\_centro\_paciente: identificación anonimizada del paciente en el estudio (ver en apartado correspondiente a muestra)
- Fecha de nacimiento
- Edad del receptor (años)
  - En tres grupos:  $\leq 39$ ; 40-59;  $> 60$
  - En dos grupos:  $\leq 59$ ;  $\geq 60$

- Sexo receptor
- Grupo ABO
- Estado serológico CMV (IgG)
- Gestaciones/abortos
- Tipaje HLA por alta resolución del receptor: Especificando, a dos campos, los siguientes *loci* HLA: *A, B, C, DRB1* y *DQB1*
- Grupo Ligando Bw4 receptor
- Grupo Ligando C receptor : C1,-; C2, -; C1+C2
- Anticuerpos anti-HLA en receptor pre-TPH

### 3.3.2. Relacionadas con el donante

#### **Variables**

- ID\_centro\_donante: identificación anonimizada del donante en el estudio (ver apartado correspondiente a muestra)
- Fecha de nacimiento
- Edad del donante
  - Edad del donante (años) en tres grupos: ≤39; 40-59; >60
- Sexo donante
- Grado de parentesco:
  - Padre; Madre; Hermano/a; Hijo/a; Sobrino/a
  - Parentesco agrupado: Hijo/a vs. resto de opciones
- Grupo ABO
- Estado serológico CMV (IgG)
- Gestaciones/abortos
- Tipaje HLA donante: Especificando los siguientes *loci* HLA: *A, B, C, DRB1* y *DQB1*
- Grupo Ligando Bw4 donante
- Grupo Ligando C donante : C1,-; C2, -; C1+C2

### 3.3.3. Relacionadas con compatibilidad entre donante y receptor

#### Definición

La **incompatibilidad ABO mayor** entre D/R se definió cuando los anticuerpos naturales anti-ABO del receptor podían provocar hemólisis grave de los hematíes del donante y, en algunos casos, retraso en el injerto eritrocitario, aplasia de la serie roja o incluso fallo del injerto (98,99) (Tabla 4).

La **incompatibilidad ABO menor** entre D/R se definió cuando el donante poseía anticuerpos, o linfocitos B capaces de generar respuesta inmune, frente al grupo ABO del receptor (98,99) (Tabla 4).

La **incompatibilidad ABO bidireccional** se definió cuando simultáneamente se daban las dos condiciones mencionadas. Es decir, el receptor tenía anticuerpos anti-ABO frente al donante y, a su vez, el donante poseía anticuerpos anti-ABO dirigidos contra el receptor (98,99) (Tabla 4).

**Tabla 4. Definición de incompatibilidad ABO en el TPH.** Fuente: Adaptado de Seebach *et al*, 2005.

	O	A, B o AB
Menor	A, B	AB
	A, B o AB	O
Mayor	AB	A, B
	A	B
Bidireccional	B	A

### **Variables**

- Incompatibilidad grupo ABO entre D/R: Isogrupo; Menor; Mayor; Bidireccional
- Grupo ABO compatible D/R
- Grupo ABO isogrupo D/R
- Estado serológico CMV D/R: +/+; +/-; -/+; -/-
- Compatibilidad sexo D/R: receptor varón donante mujer vs. otros

### **3.3.4. Relacionadas con la enfermedad de base**

#### **Definición**

El estado de la enfermedad en el momento del trasplante se clasificó del siguiente modo (100–102):

**Estadio precoz:** pacientes con LA, SLP o SMD en primera RC y leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica.

**Estadio intermedio:** pacientes con LA, SLP o SMD en segunda o superior RC, LMC en segunda fase crónica o fase acelerada, NMPc con *Disease Risk Index (DRI)* intermedio.

**Estadio avanzado:** LA y SLP refractario o en recaída, LMC en crisis blástica, anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) no tratada, NMPc con *DRI* muy alto.

### **Variables**

- Diagnóstico: LMA; Leucemia linfoblástica aguda (LLA); Linfoma de Hodgkin (LH); Linfoma no Hodgkin (LNH); SMD; LA secundaria;

LMC; NMPc; Otros (Leucemia Linfática crónica (LLC), Prolinfocítica y MM)

- Enfermedad de base
  - Enfermedad de base categorizada en dos grupos: LA +patología mieloide vs. patología linfoide+otros
  - LMA vs. Resto: LMA vs. distinto de LMA
- Estadio de la enfermedad al TPH: precoz; intermedio; avanzado
- Situación de la enfermedad pre-TPH:
  - RC; RP; enfermedad activa
  - RC vs. Distinto de RC

### **3.3.5. Relacionadas con TPH previo**

#### ***Variables***

- Trasplante previo
- Número de TPH previos
- Tipo TPH previo: Autólogo; DE HLA-idéntico; DNE HLA-idéntico; DNE no-HLA-idéntico
- Fecha TPH previo

### **3.3.6. Relacionadas con criterios de Ciurea y Champlin modificados**

En el estudio se definió como criterios de Ciurea y Champlin modificados si se cumplía alguna de las condiciones siguientes: sexo varón, joven (si este era menor o igual a 40 años) e isogrupo ABO(95). Además se estudió si la pareja D/R eran ABO compatibles. Asimismo, siguiendo el algoritmo propuesto por los autores, en todos los pacientes se descartó que tuvieran ADE (siendo este un criterio de inclusión de los donantes).

### **Variables**

- Isogrupo ABO donante/receptor
- Grupo compatible donante/receptor
- Donante varón
- Edad donante menor de 40 años
- Sexo receptor varón donante mujer vs. otros
- Número de criterios Ciurea y Champlin cumplidos en la selección del donante
  - 0,1,2,3
  - Agrupado: ninguno o un criterio cumplido vs. más de dos

### **3.3.7. Relacionadas con compatibilidad HLA**

#### **Definición**

**Haplo-TPH:** es aquel en el que donante y receptor comparten la herencia de una copia idéntica del cromosoma 6 (que contiene los genes del sistema HLA)(17).

El término *“half-matched”* se refiere a aquellos individuos en los que, respecto a los genes expresados por el sistema HLA, un haplotipo es idéntico y el otro es completamente incompatible (17).

**Haplo-TPH con compatibilidad extra:** puede darse la circunstancia de que el haplotipo HLA no compartido, aunque no sea idéntico, pueda tener compatibilidad extra en un número variable de moléculas HLA de clase I y/o II (17).

**Incompatibilidad HLA en dirección *HvG*** (receptor frente a injerto): se definió como la presencia, en el donante, de alelos no compartidos con el receptor (103).



**Incompatibilidad HLA en dirección GvH** (injerto frente a receptor): se definió como la presencia, en el receptor, de alelos no compartidos con el donante (103).

### ***Herramientas de cálculo u obtención***

Asignación de haplotipos HLA mediante segregación familiar o por probabilidad de frecuencias.

#### ***Segregación familiar***

En caso de que el estudio familiar incluyese a uno o ambos progenitores del paciente, la asignación de haplotipos materno y paterno se estableció siguiendo la ley de segregación de Mendel.

En los casos que no se contó con muestra de ningún progenitor, la asignación de los haplotipos se dedujo a partir de los hermanos haploidénticos.

#### ***Por probabilidad de frecuencias***

En los casos en los que el estudio familiar no permitió realizar la asignación del haplotipo compartido extendido (que incluyera clase I y clase II) se recurrió a la herramienta de <http://www.allelefreqencies.net/> (104–106).

### ***Variables***

- Compatibilidad HLA (*HvG*): La compatibilidad entre el sistema HLA de donante y receptor en la dirección (*Host vs. Graft*). Se tuvo en cuenta los *loci A, B, C, DRB1 y DQB1*. Es una variable que podía tomar

los valores: 5, 6, 7, 8, 9,10. Donde el valor mínimo de compatibilidad HLA era 5 y el máximo 10

- Compatibilidad HLA *HvG* agrupada (*A, B, C, DRB1, DQB1*)  
*HvG*: 5/10 vs.  $\geq 6/10$
- Incompatibilidad completa *HvG*: Si el haplotipo no compartido entre la pareja D/R era completamente diferente
- Compatibilidad extra en el haplotipo no compartido. Podía tomar tres valores: No; Sí; Identidad total bidireccional. Este último implicaba que esa compatibilidad se daba en las dos direcciones *HvG* y *GvH*. Se analizó por separado cada *locus*
  - Compatibilidad extra en el *locus A (HvG)*
  - Compatibilidad extra en el *locus B (HvG)*
  - Compatibilidad extra en el *locus C (HvG)*
  - Compatibilidad extra en el *locus DRB1 (HvG)*
  - Compatibilidad extra en el *locus DQB1 (HvG)*

Se calculó del mismo modo, y las mismas variables, pero en la dirección *GvH*.

- Compatibilidad HLA (*GvH*)
  - Compatibilidad HLA *GvH* agrupada
- Incompatibilidad completa *GvH*
- Compatibilidad extra en el haplotipo no compartido

### **3.3.8. Relacionadas con los modelos de predicción de alorreactividad**

#### **1. Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia).**

##### ***Definición***

Potencial alorreactividad si el donante poseía ligandos (HLA) ausentes en el paciente (C2, C1, Bw4 o A3/A11) (39,50,84,85). Es decir, si se daba la circunstancia que el paciente fuera homocigoto C1/C1 o C2/C2,

Bw4 negativo o A3/A11 negativo frente a donante heterocigoto C1/C2, Bw4 positivo o A3/A11 positivo respectivamente.

### **Herramientas de cálculo u obtención**

Para asignar el grupo de ligandos KIR a los alelos HLA de donante y receptor se empleó la herramienta IPD-KIR (*Immuno Polymorphism Database*)(107) <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/ligand>. Esta base de datos proporciona un depósito centralizado para secuencias KIR humanas.

Para ello se introdujo el tipaje HLA, cuatro dígitos para los *loci B y C* de la pareja D/R. Además, se tuvo en consideración el *locus A* (presencia/ausencia de A3/A11 y asignación en su caso de A\*23, A\*24, A\*25 y/o A\*32 como ligandos Bw4).

### **Variables**

Se valoró la presencia o ausencia de alorreactividad según este modelo y, en caso de darse, se evaluó la causa de la misma con los siguientes parámetros:

- Incompatibilidad C2 definida como paciente C1/C1 vs. donante C1/C2. Además, en los alorreactivos, se valoró si el donante era *KIR2DL1* positivo (equivalente a célula NK licenciada) o negativo
- Incompatibilidad C1 definida como paciente C2/C2 vs. donante C1/C2. Además, en los alorreactivos, se valoró si el donante era *KIR2DL2* y/o *2DL3* positivo (célula NK licenciada) o negativo
- Incompatibilidad Bw4 definida como paciente Bw4 negativo vs. donante Bw4 positivo. Además, en los alorreactivos, se valoró si el donante era *KIR3DL1* positivo (célula NK licenciada) o negativo

- Incompatibilidad A3/A11 definida como paciente sin A3/A11 vs. donante A3 y/o A11 positivo. Además, en los alorreactivos, se valoró si el donante era *KIR3DL2* positivo (célula NK licenciada) o negativo

Se valoró la presencia simultánea de más de una incompatibilidad en este modelo.

## 2. Incompatibilidad de ligandos KIR en dirección *HvG*

### ***Definición***

Potencial alorreactividad si el paciente tenía un ligando HLA ausente en el donante (107).

### ***Herramientas de cálculo u obtención***

Valorado según el apartado anterior pero en el sentido de la reacción alogénica opuesta.

### ***Variables***

Se valoró la presencia o ausencia de alorreactividad según este modelo y, en caso de darse, se evaluó la causa de la misma con los siguientes parámetros.

- Incompatibilidad C2 definida como donante C1/C1 vs. paciente C1/C2
- Incompatibilidad C1 definida como donante C2/C2 vs. paciente C1/C2
- Incompatibilidad Bw4 definida como donante Bw4 negativo vs. paciente Bw4 positivo
- Incompatibilidad A3/A11 definida como donante sin A3/A11 vs. paciente A3 y/o A11 positivo
-

### 3. Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)

#### **Definición**

Potencial alorreactividad si el donante tenía un receptor KIR cuyo ligando HLA afín estaba ausente en el paciente (50,89).

#### **Herramientas de cálculo u obtención**

La clasificación de los alelos HLA del paciente en grupos de ligandos KIR se realizó utilizando la herramienta IPD-KIR (*Immuno Polymorphism Database*), mencionada anteriormente (71,107).

#### **Variables**

Se valoró la presencia o ausencia de alorreactividad según este modelo y, en caso de darse, se evaluó la causa de la misma con las siguientes variables:

- Donante *KIR2DL1* positivo en paciente sin ligando C2
- Donante *KIR2DL2* y/o *2DL3* positivo en paciente sin ligando C1
- Donante *KIR3DL1* positivo en paciente sin ligando Bw4
- Donante *KIR3DL2* positivo en paciente sin ligando A3 y/o A11

Se valoró la presencia simultánea de más de una incompatibilidad en este modelo.

### 4. Ausencia de ligando KIR en receptor

#### **Definición**

Potencial alorreactividad por ausencia de algún ligando HLA en el paciente. El modelo asume que el donante expresa el KIR específico del ligando HLA ausente(91).

### **Variables**

Se valoró la presencia o ausencia de alorreactividad según este modelo y, en caso de darse, se evaluó la causa de la misma con las siguientes variables:

- Ausencia en C2
- Ausencia en C1
- Ausencia Bw4
- Combinación

## **5. Incompatibilidad *KIR* gen-gen (Nantes)**

### **Definición**

Potencial alorreactividad cuando existía un gen *KIR* en el donante que estaba ausente en el paciente o viceversa (64,93).

### **Herramientas de cálculo u obtención**

Se identificó el genotipo *KIR* de donante y receptor según la base de datos mundial de genotipos *KIR Allele frequency net database* <http://www.allelefrequencias.net/kir6001a.asp> (106,108,109).

En esta página se introdujo, manualmente, el resultado cualitativo (1=positivo o 0=negativo) para documentar la presencia o ausencia de cada uno de los siguientes genes *KIR*.

3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

**Figura 29. Genes *KIR*.** Fuente: González-Galarza *et al*, 2020(109).

### **Variables**

Se valoró la presencia o ausencia de alorreactividad según este modelo y, en caso de darse, se evaluó la causa de la misma con las siguientes variables:

- Número de genes incompatibles entre donante y receptor y dirección de la incompatibilidad *GvH* o *HvG*:
  - Una incompatibilidad
  - Dos incompatibilidades en el mismo sentido
  - Dos o más incompatibilidades en sentido distinto
- Tipo de incompatibilidad: *KIR2DL1*; *KIR2DL2*; *KIR2DL3*; *KIR2DL4*; *KIR2DL5*; *KIR3DL1*; *KIR3DL2*; *KIR3DL3*; *KIR2DS1*; *KIR2DS2*; *KIR2DS3*; *KIR2DS4*; *KIR2DS5*; *KIR3DS1*
- Genotipo KIR: Número de identificación del genotipo KIR. Los valores que puede alcanzar son de 1 a 720 (ambos inclusive) que eran los genotipos KIR descritos hasta el momento

## 6. Modelo de haplotipo KIR o grupo KIR-B donante (Standford)

### **Definición**

Este modelo se basa en el contenido en genes *KIR-B* activadores del donante y se definió según Cooley *et al.*, 2010 (50) (49).

### **Herramientas de cálculo u obtención**

En función del genotipo *KIR* de cada donante, se determinaron los siguientes parámetros:

- Heterocigosidad y homocigosidad del contenido génico centromérico (Cen) y telomérico (Tel) del *locus KIR* (49) (Tabla 5).
- Determinación del haplotipo KIR: AA, AB, BB (49,74) (Tabla 6).

**Tabla 5. Grupos asignados en función de los genes *KIR* centroméricos y teloméricos.** Fuente: Adaptado de Cooley *et al.*, 2010(49).

Centromérico ( <i>2DS2</i> , <i>2DL2</i> , <i>2DL3</i> )	
Cen-A/A	<i>2DL3</i> aislado
Cen-A/B	<i>2DL3</i> con <i>2DS2</i> y/o <i>2DL2</i>
Cen-B/B	<i>2DS2</i> y/o <i>2DL2</i> sin <i>2DL3</i>

Telomérico (3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)	
Tel-A/A	3DL1 y 2DS4 aislados
Tel-A/B	3DL1 y 2DS4 con 3DS1 y/o 2DS1
Tel-B/B	Ausencia de 3DL1 y/o 2DS4

Para expresar, matemáticamente, el modelo de Standford se utilizó la puntuación del contenido *KIR-B* calculada como el sumatorio del número de dominios Cen-B y / o Tel-B en cada genotipo, pudiendo ir de 0-4 (49) (Tabla 6).

**Tabla 6. Determinación del haplotipo KIR y puntuación de contenido *KIR-B*.**

Fuente: Adaptado de Cooley *et al.*, 2010(49).

Genotipo <i>KIR</i> donante	Puntuación de contenido B	Centrómero	Telómero
A/A	0	AA	AA
B/x	1	AA	AB
		AB	AA
	2	AA	BB
		AB	AB
		BB	AA
	3	AB	BB
		BB	AB
	4	BB	BB

Para asignar la puntuación del contenido de genes *KIR-B* (*B-content score*) para los individuos Bx, se realizó valoración numérica del contenido en genes *KIR-B* (0, 1, 2, 3 o 4) y se clasificó el donante en las categorías “Best”, “Better” o “Neutral” según el modelo desarrollado por Cooley *et al.*, 2010(49,94) (Tabla 7) y utilizando la calculadora *B-content score* de la base de datos IPD-KIR (110).



**Tabla 7. Modo de asignar la clasificación: *Neutral*, *Better* o *Best*.** Fuente: Adaptado de Mehta y Oran, 2019(94).

Genotipo KIR	Contenido de <i>KIR-B</i>	Haplotipo centromérico	Haplotipo telomérico	Clasificado como categoría
A/A	0	A/A	A/A	<i>Neutral</i>
B/x	1	A/A	A/B	<i>Neutral</i>
	1	A/B	A/A	<i>Neutral</i>
	2	A/A	B/B	<i>Better</i>
	2	A/B	A/B	<i>Better</i>
	2	B/B	A/A	<i>Best</i>
	3	A/B	B/B	<i>Better</i>
	3	B/B	A/B	<i>Best</i>
	4	B/B	B/B	<i>Best</i>

Las personas clasificadas como *Better* tiene 2 o más dominios B sin que estos se encuentren los dos en centrómero. Mientras que los clasificados como *Best* tienen 2 o más dominios B siendo indispensable que a nivel centromérico el haplotipo sea BB. Los que se clasifican como *Neutral* se corresponden con aquellos cuyo *B-content score* es de 0 o 1.

### **Variables**

- Grupo KIR-B donante (Stanford): *Neutral*; *Better*; *Best*
  - Grupo KIR B donante agrupado: *Neutral* vs. (*Better*+ *Best*)
- Haplotipo KIR centrómero donante: AA; AB; BB
- Haplotipo KIR telómero donante: AA; AB; BB
- Grupo de haplotipos KIR donante: AA; AB (sinónimo de Bx de la literatura); BB.
  - Grupo de haplotipos KIR donante agrupado: AA vs. Bx(AB+BB)
- Gen *2DS2* en donante: No; Sí
- *B-content score* donante: Que puede ser 0; 1; 2; 3 o 4 (cantidad de contenido en genes *KIR-B* activadores del donante)
  - *B-content score* donante agrupado: 0 vs. 1 vs. (2+3+4)

Un variante del modelo de Standford, aplicada en este proyecto, fue la predicción de alorreactividad teniendo en cuenta el genotipo KIR del receptor y comparando los grupos de haplotipos KIR entre donante y receptor

### **Variables**

- Compatibilidad grupo de haplotipos KIR donante/receptor: Donante AA para receptor AA; Donante AB para receptor AA; Donante AB para receptor AB; Donante AA para receptor AB
- Grupo de haplotipos KIR receptor: AA; AB; BB.
  - Grupo de haplotipos KIR agrupado AA vs. Bx(AB+BB)
- *B-content score receptor*: puede ser 0;1;2;3 o 4 (cantidad de contenido en genes *KIR-B* activadores del receptor)
  - *B-content score receptor* agrupado: 0 vs. 1 vs. (2+3+4)

### **3.3.9. Relacionadas con TPH haploidéntico**

Durante el periodo del estudio los regímenes de acondicionamiento MA que se emplearon fueron (Figura 30):

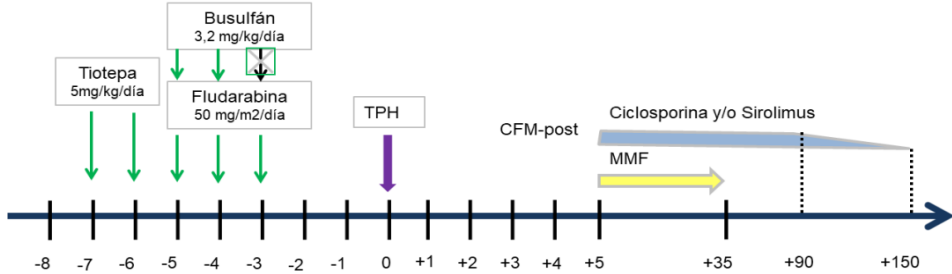
- Tiotepa iv(10 mg/kg, en 2 días, días -7 y -6) + Busulfán iv (9,6 mg/kg, en 3 días, días -5 a -3) + Fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>, en 3 días, días -5 a -3)
- Busulfán iv (12,8 mg/kg, en 4 días, días -6 a -3) + Fludarabina (160 mg/m<sup>2</sup>, en 4 días, días -6 a -3)

Y dentro de los AIR:

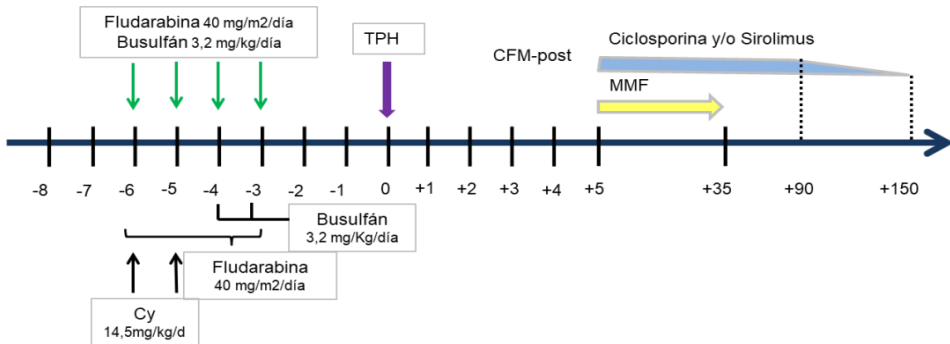
- Tiotepa (10 mg/kg, en 2 días, días -7 y -6) + Busulfán iv (6,4 mg/kg, en 2 días, días -5 a -4) + Fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>, en 3 días, días -5 a -3)

- Busulfán iv (6,4 mg/kg, en 2 días, días -4 y -3) + Fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>, en 5 días, días -6 a -2) + Ciclofosfamida iv (29 mg/kg, en 2 días, días -6 y -5)

A. TBF acondicionamiento MA y AIR (X)



B. Bu-Flu- acondicionamiento MA



C. Bu-Flu-Cy AIR

**Figura 30. Esquemas de acondicionamiento MA y AIR.** Fuente: Adaptado de Montoro *et al.*, 2020 (111).

**Variables**

- Fecha trasplante
- Régimen de acondicionamiento: AIR; MA
- Esquemas de acondicionamiento:
  - Ciclofosfamida+Fludarabina+Busulfán;
  - Tiotepa+ Busulfán+Fludarabina
  - Fludarabina+Busulfán+Tiotepa; Otros

- Profilaxis EICR agrupada:
  - ICN aislada
  - ICN + MMF
  - ICN + Sirolimus + MMF
- Fuente PH: SP; MO
- CMN ( $\times 10^8$ /Kg)
- Células CD34+ ( $\times 10^6$ /Kg)
- Células CD3+ ( $\times 10^7$ /Kg)

### 3.3.10. Relacionadas con injerto postrasplante

**Injerto mieloide:** primer día, de tres consecutivos, en el que se constata recuento absoluto de neutrófilos igual o superior a  $0,5 \times 10^9$ /L (112).

**Injerto plaquetario:** primer día en el que se objetiva un recuento de plaquetas igual o superior a  $20 \times 10^9$ /L, sin requerir transfusión de plaquetas en los siete días siguientes (112).

**Fallo de injerto primario:** ausencia de injerto mieloide y plaquetario en los pacientes que sobrevivieron al menos 28 días (+/- 7 días) tras la infusión de PH (112).

**Fiebre alorreactiva:** temperatura de 38 a  $38,2^\circ\text{C}$  en dos tomas consecutivas separadas al menos una hora o una única determinación de temperatura  $\geq 38,3^\circ\text{C}$ , que aparece hasta 6-7 días después del trasplante que, en criterio del médico responsable, no tiene relación con proceso infeccioso evidente (113).

#### **Variables**

- Fallo de injerto primario

- Fallo de injerto primario en neutrófilos
- Fallo de injerto primario en plaquetas
- Injerto mieloide alcanzado en neutrófilos
- Injerto mieloide alcanzado en plaquetas
- Fiebre alorreactiva

### 3.3.11. Relacionadas con enfermedad injerto contra receptor aguda (EICRa) y crónica (EICRc)

**Enfermedad injerto contra receptor aguda y crónica:** para la definición y gradación de la EICRa se utilizó los clasificación de Glucksberg *et al.* (114–116) (Tabla 8) y para la EICRc la clasificación del grupo de consenso del *National Institutes of Health* (NIH) 2015 o la de Seattle (116–118) (Tabla 9 y 10 respectivamente).

**Tabla 8. Grados de EICR aguda global.** Fuente: Adaptado de Glucksberg et al., 1974 (114).

Grado global	Cutáneo	Hepático	Gastrointestinal	Afectación del estado general
Grado 0	0	0	0	0
Grado 1	+ / ++	0	0	0
Grado 2	+ / +++	+	+	+
Grado 3	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++
Grado 4	++ / ++++	++ / ++++	++ / ++++	+++

**Tabla 9. Grados de EICR crónica global: leve, moderada, grave.** Fuente: Adaptado de Jagasia *et al.*, 2015 (117).

Grado global	EICRc
Leve	1 o 2 órganos afectados (grado máximo 1) + Afectación pulmonar (grado 0)
Moderada	> 3 órganos afectados (grado máximo de 1) o Al menos 1 órgano (no pulmón) afecto con grado 2 o Afectación pulmonar (grado 1)

Grado global	EICRc
Grave	Al menos 1 órgano afecto con grado 3 o Afectación pulmonar (grado $\geq 2$ )

**Tabla 10. EICRc limitada vs. extensa.** Fuente: Adaptado de Shulman *et al.*, 1980 (116).

Grado global	EICRc
Limitada	Se cumple uno o ambos criterios: 1. Afectación cutánea localizada 2. Disfunción hepática debida a EICRc
Extensa	Se cumple cualquiera de estos criterios 1. Afectación cutánea generalizada 2. Afectación cutánea localizada y/o disfunción hepática debida a EICRc y además: a) Histología hepática con signos de hepatitis crónica agresiva, necrosis en puente o cirrosis; o b) Compromiso del ojo: prueba de Schirmer con menos de 5 mm mojar; o c) Afectación de glándulas salivales menores o mucosa oral demostrado en biopsia labial; o d) Afectación de cualquier otro órgano diana.

**Variables**

- EICR aguda: No; Sí; Desconocido
- EICR crónica: No; Sí; Desconocido
  - Gravedad EICR crónica: Leve; Moderada; Grave o Limitada y Extensa

### 3.3.12. Relacionadas con situación del paciente y la enfermedad en última visita

**Supervivencia libre de enfermedad (SLE)** se definió como el tiempo que un paciente sobrevive, sin recaída o progresión de la enfermedad de base, desde la fecha del trasplante (119).

La **supervivencia global (SG)** se definió como el tiempo desde el haplo-TPH hasta fecha del último seguimiento (119).

La **mortalidad no relacionada con la recaída (MNRR)** se definió como la muerte por cualquier causa, sin evidencia de recaída o progresión previa o en el momento de la muerte (120).

La **recaída** se definió como la recidiva o progresión de la hemopatía maligna de base tras el haplo-TPH(121).

#### **Variables**

- Fecha última visita
- Estatus del receptor: muerto; vivo
- Estatus de la enfermedad en última visita: No evaluado; Remisión; Recaída/Progresión
- Inmunosupresión en el último seguimiento: No; Sí; No aplica (porque han fallecido o porque no habían desarrollado EICR o esta era de grado I).
- SLE, con posibles valores: Vivo y sin enfermedad (sin recaída); Muerto o vivo con enfermedad (recaída). La variable tiempo dependiente asociada se obtuvo calculando el tiempo desde trasplante hasta la última visita (si no había existido recaída) y en

los pacientes que habían recaído (vivos o muertos), el tiempo desde el trasplante hasta la recaída.

- SG, con posibles valores: muerto; vivo. La variable tiempo-dependiente asociada fue el tiempo desde trasplante hasta la fecha de la última visita.
- MNRR, con posibles valores: muerto sin recaída; vivo sin recaída; recaída. La variable tiempo-dependiente se calculó con la fecha de última visita censurando por fecha de recaída.
- Recaída, con posibles valores: vivo sin recaída; recaída; muerto sin recaída. La variable tiempo dependiente fue el tiempo de seguimiento en meses desde el haplo-TPH.

### **3.4. MUESTRAS, PROCESOS Y TÉCNICAS.**

#### **3.4.1. Tipos de muestras analizadas y proceso de recolección**

Las muestras se extrajeron en los 30 días previos al trasplante. Del donante y receptor se obtuvo un tubo de SP con EDTA (6mL), para estudiar el sistema *HLA* mediante técnica de alta resolución y el genotipado *KIR*. Además, del receptor se extrajo un tubo de suero (6 mL) para analizar el estado de inmunización frente al sistema *HLA* realizando escrutinio/identificación de anticuerpos anti-*HLA*.

Las muestras fueron enviadas refrigeradas (2-8°C) al hospital centralizador (Hospital Clínico Universitario de Valencia), junto con la petición identificadora de paciente, de su correspondiente donante (Anexo VIII) y el consentimiento informado.



La identificación de los tubos con las muestras biológicas se realizó, mediante código alfanumérico, del siguiente modo: Código del centro/número de paciente/diferenciar si la muestra era del donante vs. receptor/ Momento TPH (fecha).

Posteriormente, las muestras del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Hospital Universitario y Politécnico la Fe se enviaron al Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana (CTCV) para su análisis genotípico *HLA*, *KIR* y estudio de anticuerpos anti-*HLA*. Además, el CTCV llevó a cabo el genotipo *KIR* de las muestras procedentes del Hospital Universitario de Son Espases.

### **3.4.2. Técnicas de obtención de datos**

#### **3.4.2.1. Técnicas de tipaje por biología molecular**

Los pacientes se incluyeron en el estudio entre 2015-2020. Por tanto coexistieron distintas técnicas que a continuación se describen. El procedimiento detallado de cada técnica se encuentra como material suplementario (Anexo IX).

##### **3.4.2.1.1. Extracción de ADN**

Se llevó a cabo de forma automatizada utilizando los reactivos *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit DNA extraction. Promega* (Madison, Wisconsin, USA) hasta 2019 y, posteriormente, con *EZ1 DSP DNA Blood Kit*. Qiagen. (Hilden, Alemania). Tras la extracción se determinó por espectrofotometría la concentración de ADN y su grado de pureza. Se consideró muestra óptima para el análisis obteniendo concentración de ADN determinada en función de la técnica que se fuera a realizar (Tabla 11) y pureza de ADN

(260/280) superior a 1,7. En caso de pureza inferior a 1,5, se repitió el proceso de extracción de ADN a partir de la muestra original (Anexo IX).

**Tabla 11. Concentración de ADN óptima en función de la técnica.**

Técnica	Concentración ADN
<b>SSO</b>	20-80 ng/μL
<b>SSP</b>	30 ng/μL
<b>NGS</b>	20-80 ng/μL
<b>SBT</b>	20-30 ng/μL
<b>KIR</b>	30 ng/μL

### 3.4.2.1.2. Tipaje HLA

#### 3.4.2.1.2.1. Resolución intermedia: rSSO

**PCR-rSSO:** (*Polymerase Chain Reaction Reverse Sequence Specific Oligotyping*). Reacción en cadena de la polimerasa seguida de hibridación reversa con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia y detección por citometría de flujo con plataforma Luminex (122–124). Esta técnica se empleó para el tipaje HLA primario de donantes de primer grado, loci A, B y DRB1, con el objetivo de encontrar los candidatos a ser HLA-idénticos o haploidénticos, cuyo estudio continuó con técnica de alta resolución. Asimismo, con ella se descartaron los donantes sin compatibilidad HLA con el receptor. Además, esta técnica fue la empleada para el tipaje HLA-confirmatorio.

Los reactivos fueron *Labtype CWD SSO-OneLambda* (Hannover, Alemania) y *Lifecodes HLA-SSO Typing Immucor* (Dreieich, Alemania). A su vez, los programas informáticos de análisis fueron HLA-Fusion (One Lambda) y MatchIT DNA

(Immucor) respectivamente, ambos con el programa xPONENT para control del citómetro (Anexo IX).

#### 3.4.2.1.2.2. Alta resolución: SSP /SBT/NGS

**PCR-SSP:** PCR con *primers* específicos de secuencia. (*Sequence-Specific Primers*) (125,126) y su visualización mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con *Real safe Nucleic Acid Staining Solution (20000x)*.

Los reactivos, tanto para la resolución baja como alta, fueron Olerup SSP (CareDx, Franzéngatan, Estocolmo). La interpretación de los resultados se realizó con el programa “HELMBERG-SCORE™” (Anexo IX).

**SBT:** *Sequence-based typing* (SBT) (127). La tipificación basada en SBT se realizó siguiendo el protocolo “SBTexcellerator” de GenDx (Utrecht, Países Bajos) y análisis mediante el software SBTengine® (Anexo IX).

**NGS:** *Next-generation’ sequencing* o NGS. A partir de 2018 comenzó a introducirse, en los laboratorios de Histocompatibilidad, esta nueva metodología de secuenciación (128–130).

Se empleó NGS tanto en formato single como multiplex siguiendo el protocolo “NGSgo®-AMPX” y “NGSgo®-MX6” respectivamente, de GenDx (Utrecht, Países Bajos), en plataforma Illumina y análisis mediante el

software NGSengine® de los seis *loci* *HLA-A, B, C, DRB1, DQB1* y *DPB1* (Anexo IX).

#### **3.4.2.1.3. Tipaje KIR**

A las parejas D/R se les realizó el estudio de presencia/ausencia de los 15 genes *KIR* (*KIR2DL1, 2DL2/L3, 2DL4, 2DL5A, 2DL5B, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1/S1, 3DL2, 3DL3*) y dos pseudogenes (*2DP1* y *3DP1*) que constituyen el genotipo *KIR*. El estudio se realizó por PCR-SSO (131,132) utilizando los reactivos *KIR SSO Genotyping Test* (One Lambda, West Hills, Canadá, Estados Unidos de América) y análisis con el programa informático Fusion KIR o por PCR-SSP (133–135) con los reactivos *KIR Genotyping Olerup SSP* (CareDx, Franzéngatan, Estocolmo) con interpretación manual (Anexo IX).

#### **3.4.2.2. Técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA**

##### **3.4.2.2.1. Cribado de anticuerpos anti-HLA.**

Ensayo de detección de anticuerpos anti-HLA de clase I y II mediante técnica *bead array* utilizando los reactivos *LABScreen™ Mixed Class I & II: Screening Clase I, II* y *MICA* (One Lambda, Hannover, Alemania) y análisis posterior en citómetro Luminex Flex Map3D con el programa Fusion (One Lambda) (136,137).

Para considerar la técnica de cribado positiva se estableció un valor *Raw* de 1000 IFM (intensidades de fluorescencia media) (Anexo X).

#### **3.4.2.2.2. Identificación de anticuerpos anti-HLA**

Ensayo de identificación de anticuerpos anti-HLA mediante la técnica *bead array* de antígeno único (*single antigen*). Se utilizaron los reactivos *LABScreen™ Single Antigen Class I*, (One Lambda) para la identificación de aloinmunización frente al sistema HLA de clase I; y el reactivo *LS2A01*, *LABScreen™ Single Antigen Class II* (One Lambda) para la identificación de aloinmunización frente al sistema HLA de clase II.

En ambos casos, el análisis se llevó a cabo en un citómetro Luminex Flex Map3D y software Fusion.

Para considerar un valor positivo se estableció un valor de 1500 IFM (valor normalizado). Como se ha indicado anteriormente, para entrar en el estudio ningún paciente debía tener ADE (Anexo X).

### **3.5. CRITERIOS DE CALIDAD**

Se siguieron los criterios de calidad según la normativa ISO 9001 (Organización Internacional para la Estandarización), y los estándares de la versión vigente de criterios establecida por la EFI (*European Federation for Immunogenetics*. Federación europea para estudios Inmunogenéticos).

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los análisis se realizaron utilizando los softwares *IBM SPSS Statistics for Windows*, versión 20.0. (*IBM Corp., Armonk, N.Y., USA*) y R Project R studio

versión 4.0.5 (138) (R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: [https://www.R-project.org/.](https://www.R-project.org/)) Como valor de probabilidad estadísticamente significativo se estableció aquel cuyo valor de “p” bilateral fuera inferior o igual a 0,05.

### 3.6.1. Análisis descriptivo

Las variables cuantitativas se expresaron como media y/o mediana con su rango, mientras que las cualitativas se expresaron como frecuencia y porcentaje.

Las probabilidades de SLE, SG se estimaron mediante método de supervivencia Kaplan Meier (139) y se compararon empleando la prueba de log-rank (140).

Además, se comprobó si la distribución de las frecuencias estudiadas de alelos del sistema HLA estaban en equilibrio Hardy Weinberg mediante las herramientas HLA.NET (141–143). A su vez, el test de neutralidad Ewens-Watterson-Slatkin se llevó a cabo con programa PyPop (*python for population genomics*) (18,144). La desviación normalizada del estadístico de homocigosidad de Ewens-Watterson ( $F_{nd}$ ) se calculó en base a las frecuencias alélicas observadas en cada *locus* HLA y se empleó para inferir la acción de selección en equilibrio ( $F_{nd} \ll 0$ ) o direccional ( $F_{nd} \gg 0$ ) en cada *locus* HLA (145). Se obtuvo el p-valor para la desviación normalizada del estadístico F después de la corrección de Bonferroni (146,147).

El desequilibrio de ligamiento, se analizó con HLA.NET (141–143). Sólo se valoró cuando la frecuencia del par de *loci* se encontró representada en más del 5% de la población de estudio. Considerando, además, que solo aquellos

pares de *loci* que estaban en desequilibrio de ligamiento positivo eran reales. Para referirse al desequilibrio de ligamiento se empleó *stdres* (***standard residuals***). Un *stdres* mayor de 1,96 supuso una desviación positiva del equilibrio (es decir, que esa asociación se observaba con mayor frecuencia a lo esperado) (101). Ya que 1,96 supone la distribución normal para determinar la probabilidad de ese intervalo de confianza del 95% asociada con la frecuencia genética estimada (91).

### **3.6.2. Análisis univariable**

Los eventos analizados, de interés clínico, en el TPH fueron: EICRa I-IV, EICRa II-IV; EICRa III-IV; EICRc; MNRR, recaída, SLE y SG.

Las variables incluidas en los análisis de los diferentes eventos y que ocurrieron tras la infusión de PH fueron consideradas y analizadas como variables tiempo-dependientes.

El riesgo de EICRa I-IV, EICRa II-IV; EICRa III-IV; EICRc; MNRR y recaída se estimó mediante el método de incidencia acumulada (IA) (148).

La probabilidad de cada evento fue estimada a los 5, 10, 15, 20 y 25 meses en el caso de EICRc; a los 3, 6, 12 y 29 meses en el caso de MNRR; a los 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 días para la EICRa I-IV, EICRa II-IV y EICRa III-IV.

El riesgo de evento, de las variables tiempo dependiente de SG, SLE se estimó mediante análisis de regresión de COX cuyo resultado se expresó como Hazard ratio (149,150).

Aquellas variables que obtuvieron un valor de “p” bilateral fue  $<0,1$  en el análisis univariable o las que no alcanzaron este valor pero tenían interés

clínico y/o habían mostrado asociación fuerte con el evento en estudios previos fueron incluidas en el análisis multivariable.

### **3.6.3. Análisis multivariable**

Cuando la variable dependiente tenía dos categorías posibles, se empleó el método de regresión de riesgo proporcional de Cox (149). Para los modelos que valoraron la recaída y MNRR, al ser de riesgos competitivos y tener tres categorías posibles, se empleó test de Fine and Gray (151).

Con el objetivo de identificar el análisis multivariable con mayor ajuste, se seleccionaron las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*) (152).



## **Resultados**



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS: PACIENTES, DONANTES, ENFERMEDAD Y TPH**

#### **4.1.1. Pacientes**

El tamaño muestral final fue de 113 parejas D/R. La mediana de edad de los pacientes fue de 54 años (22-72 años), con ligero predominio de varones (56,6%). Cincuenta y cinco pacientes (48,7%) presentaron diagnóstico de LA, de los que 35 (31%) tenían LMA. El segundo diagnóstico más frecuente fue el de SMD (16%). La patología mieloide predominó sobre la linfoide. Esta última, representada principalmente por pacientes con LH y LNH, supuso el 27,4% (n= 26). La mayoría de pacientes tenían un estadio intermedio de la enfermedad (47,8%) y se encontraban en situación de RC (45,1%) antes del haplo-TPH (Tabla 12).

Un total de 39 pacientes (34,5%) había recibido previamente un TPH autólogo o alogénico y el 54,9% de los pacientes presentaban enfermedad activa (enfermedad estable, recaída, progresión o respuesta parcial) en el momento del haplo-TPH.

#### **4.1.2. Donantes**

El promedio de donantes estudiados por paciente fue de 2,5 (1-6). En el 70,8% de los casos se seleccionó un donante varón. Asimismo, 70 donantes (61,9%) tenían una edad inferior a 40 años (edad media de 38 años) y solo 47 pacientes (41,6%) de la serie cumplían los siguientes criterios de Ciurea y Champlin: donante joven, varón, isogrupo ABO con el receptor y ausencia de anticuerpos anti-HLA donante específicos en el receptor (Tabla 12).

### 4.1.3. Pareja D/R

Setenta y cinco parejas D/R (66,4%) compartían el mismo grupo sanguíneo (ABO). En 17 casos había incompatibilidad mayor ABO (15,1%). Respecto al estado serológico de CMV (IgG) de D/R el 73,5% fueron positivos ambos mientras que en el 21,2% el D era CMV seronegativo con R CMV seropositivo. En cuanto a la compatibilidad HLA D/R, más de la mitad de los casos fueron *half-matched* (es decir, tuvieron incompatibilidad de un haplotipo HLA completo 5 *loci*/10). En un caso la compatibilidad D/R fue 10/10 en dirección *HvG*, 5/10 en dirección *GvH* por ser el donante homocigoto al haplotipo no compartido y el receptor heterocigoto (Tabla 12). Hubo compatibilidad HLA 5/10 en sentido *HvG* en el 57,5% y en sentido *GvH* en el 54% de los casos. Entre los donantes más habituales estuvo primer lugar hijo/a (61,1%) seguido del de hermano/a (28,3%) (Tabla 12).

### 4.1.4. Fuente de PH y acondicionamiento del haplo-TPH

En la mayoría de los casos (87,6%) la fuente de PH empleada fue SP, con una mediana de  $6,33 \times 10^6$ /kg células CD34+. Asimismo, el AIR representó el 70,8% de los casos, predominando el acondicionamiento con fludarabina asociada a busulfán y tiotepa (50,4%). La profilaxis de la EICR más utilizada fue inhibidor de calcineurina junto con MMF (64,6%) (Tabla 12).

**Tabla 12. Características clínicas.**

Características	(N= 113 parejas donante-receptor), n (%)*
<b>Edad receptor</b>	
Mediana, años (rango)	54 años (22-72)
Categorizada, años	
20-39	21(18,6%)
40-59	40 (35,4%)
>60	52 (46%)

<b>Características</b>	<b>(N= 113 parejas donante-receptor), n (%)*</b>
<b>Sexo del receptor</b>	
Varón	64 (56,6%)
Mujer	49 (43,4%)
<b>Antecedente obstétrico receptor (gestación/aborto)</b>	
Sí	34 (69,4%)
No	8 (16,3%)
Desconocido	7 (14,3%)
<b>Diagnóstico</b>	
LMA	35 (31%)
LLA	15 (13,3%)
LH	11 (9,7%)
LNH	15 (13,3%)
SMD	18 (16%)
LAS	5 (4,4%)
LMC	4 (3,5%)
NMPc/ Otros	10 (8,8%)
<b>Diagnóstico categorizado</b>	
Leucemia más patología mieloide	79 (69,9%)
Patología linfoide	31 (27,4%)
Otros	3 (2,7%)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>	
Estadio precoz	44 (38,9%)
Estadio intermedio	54 (47,8%)
Estadio avanzado	15 (13,3%)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>	
Remisión completa	51 (45,1%)
Remisión parcial	35 (31%)
Recaída o progresión	27 (23,9%)
<b>Trasplante previo y tipo, n 39 (34,5%)</b>	
Auto-TPH	28 (24,8%)
Alo-TPH	11 (9,7%)
- DE HLA-idéntico	6 (5,3%)
- DNE HLA-idéntico	4 (3,5%)
- DNE no-HLA-idéntico	1 (0,9%)
<b>CMV estado serológico D/R</b>	
+/+	75 (66,4%)
+/-	6 (5,3%)
-/+	24 (21,2%)
-/-	8 (7,1%)
<b>Grupo ABO incompatibilidad D/R, n 38 (33,6%)</b>	
Menor	21 (18,5%)
Mayor	14 (12,4%)
Bidireccional	3 (2,7%)
<b>Criterio utilizado para selección donante (Ciurea)</b>	
Grupo ABO compatible D/R	96 (85%)
Grupo ABO isogrupo D/R	75 (66,4%)
Donante varón	80 (70,8%)
Edad donante <40 años	70 (61,9%)

<b>Características</b>	<b>(N= 113 parejas donante-receptor), n (%)*</b>
Media de criterios Ciurea cumplidos en la selección donante	2,16
Mediana criterios Ciurea cumplidos en la selección donante	2
3/3 Criterios Ciurea en la selección del donante	47 (41,6%)
2/3 Criterios Ciurea en la selección del donante	40 (35,4%)
1/3 Criterios Ciurea en la selección del donante	23 (20,4%)
0/3 Criterios Ciurea en la selección del donante	3 (2,7%)
<b>Compatibilidad HLA (A, B, C, DRB1, DQB1) HvG</b>	
5/10	65 (57,5%)
6/10	30 (26,6%)
7/10	12 (10,6%)
8/10	4 (3,5%)
9/10	1 (0,9%)
10/10	1 (0,9%)
<b>Compatibilidad HLA (A, B, C, DRB1, DQB1) GvH</b>	
5/10	61 (54%)
6/10	33 (29,2%)
7/10	10 (8,8%)
8/10	8 (7,1%)
9/10	1 (0,9%)
10/10	0
<b>Edad donante</b>	
Mediana, años (rango)	38 años (2-68)
Categorizada	
2-39	70 (61,9%)
40-59	36 (31,9%)
>60	7 (6,2%)
<b>Grado de parentesco donantes</b>	
Padre	6 (5,3%)
Madre	4 (3,5%)
Hermano/a	32 (28,3%)
Hijo/a	69 (61,1%)
Sobrino/a	2 (1,8%)
<b>Potencial alorreactividad del donante según modelo</b>	
Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)	40 (35,4%)
Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)	94 (83,2%)
Ausencia de ligando KIR en receptor	74 (65,5%)
Incompatibilidad <i>KIR-KIR</i> (Nantes)	71 (62,8%)
Grupo KIR-B donante (Standford)	43(38,1%)
<b>Profilaxis EICR</b>	
ICN aislada	17 (15%)
ICN + MMF	73 (64,6%)
ICN+Sirolimus + MMF	23 (20,4%)
<b>Tipo de acondicionamiento</b>	
Intensidad reducida	80 (70,8%)
Mieloablatoivo	33 (29,2%)

Características	(N= 113 parejas donante-receptor), n (%)*
<b>Régimen de acondicionamiento</b>	
Bu-Flui-Cy	27 (23,9%)
TT-Bu-Flu	68 (60,1%)
Otros	18 (16%)
<b>Fuente de progenitores</b>	
Sangre periférica	99 (87,6%)
Médula ósea	14 (12,4%)
<b>Media de CD34+ x10<sup>6</sup>/kg, (rango)</b>	Media 6,33; Mediana 6,02; Rango (1,42-13,23).

\*Salvo que se indique lo contrario.

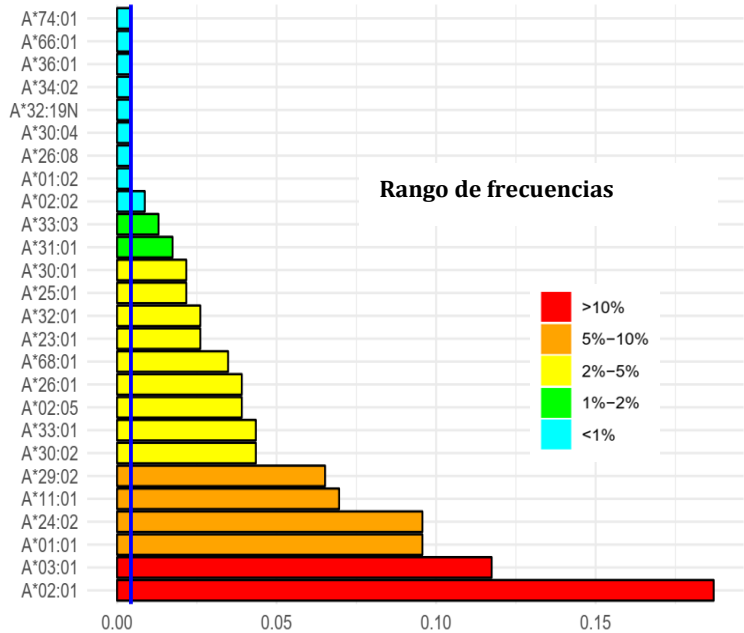
**Abreviaturas:** **ATG:** antitumoglobulina; **Bu:** Busulfán; **CMV:** Citomegalovirus; **Cy:** Ciclofosfamida; **D:** Donante; **DE:** Donante emparentado; **DNE:** Donante no emparentado. **Flu:** Fludarabina; **GvH:** *Graft versus host*; **HvG:** *Host versus graft*; **ICN:** inhibidor calcineurina; **LH:** Linfoma de Hodgkin; **LLA:** Leucemia Linfoide Aguda; **LMA:** Leucemia Mieloide Aguda; **LNH:** Linfoma no Hodgkin; **Mel:** melfalán; **MMF:** micofenolato de mofetilo; **NMPc:** Neoplasia mieloproliferativa; **R:** Receptor; **RC:** Remisión completa; **RP:** Remisión parcial; **SMD:** Síndrome mielodisplásico; **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos. **TT:** Tiotepa.

## 4.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL SISTEMA HLA

Se analizaron las características y frecuencias de los *loci* *HLA-A*, *C*, *B*, *DRB1* y *DQB1* en los pacientes (N=113) y el polimorfismo alélico encontrado con resolución hasta segundo campo fue para: *HLA-A* 26, *HLA-C* 25, *HLA-B* 46, *HLA-DRB1* 33 y *HLA-DQB1* 16. El *locus* con mayor diversidad fue *HLA-B* y el de menor *HLA-DQB1*. Las frecuencias estimadas de cada alelo presente en el sistema HLA de los pacientes se recogen, por *locus*, en las tablas siguientes (Tablas 13-17). Asimismo, se descarta la existencia de desviaciones respecto al equilibrio esperado de Hardy-Weinberg en los *loci*-*HLA* analizados (Tablas 13-17).

**Tabla 13. Frecuencias alélicas halladas en los pacientes para el locus HLA-A.**

Alelo HLA-A	Frecuencia
A*02:01	0,1870
A*03:01	0,1174
A*24:02	0,0957
A*01:01	0,0957
A*11:01	0,0696
A*29:02	0,0652
A*30:02	0,0435
A*33:01	0,0435
A*26:01	0,0391
A*02:05	0,0391
A*68:01	0,0348
A*23:01	0,0261
A*32:01	0,0261
A*25:01	0,0217
A*30:01	0,0217
A*31:01	0,0174
A*33:03	0,0130
A*02:02	0,0087
A*36:01	0,0043
A*34:02	0,0043
A*32:19N	0,0043
A*66:01	0,0043
A*30:04	0,0043
A*01:02	0,0043
A*74:01	0,0043
A*26:08	0,0043



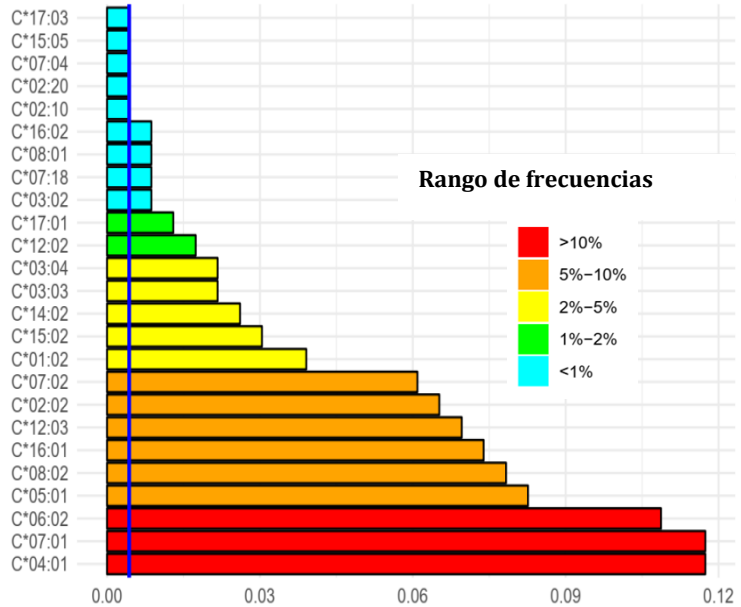
Heterocigosidad estimada: 0,9128

Test de equilibrio Hardy-Weinberg, p-valor: 0,9996



Tabla 14. Frecuencias alélicas halladas en los pacientes para el locus HLA-C.

Alelo HLA-C	Frecuencia
C*04:01	0,1174
C*07:01	0,1174
C*06:02	0,1087
C*05:01	0,0826
C*08:02	0,0783
C*16:01	0,0739
C*12:03	0,0696
C*02:02	0,0652
C*07:02	0,0609
C*01:02	0,0391
C*15:02	0,0304
C*14:02	0,0261
C*03:04	0,0217
C*03:03	0,0217
C*12:02	0,0174
C*17:01	0,013
C*03:02	0,0087
C*07:18	0,0087
C*16:02	0,0087
C*08:01	0,0087
C*02:10	0,0043
C*17:03	0,0043
C*07:04	0,0043
C*02:20	0,0043
C*15:05	0,0043

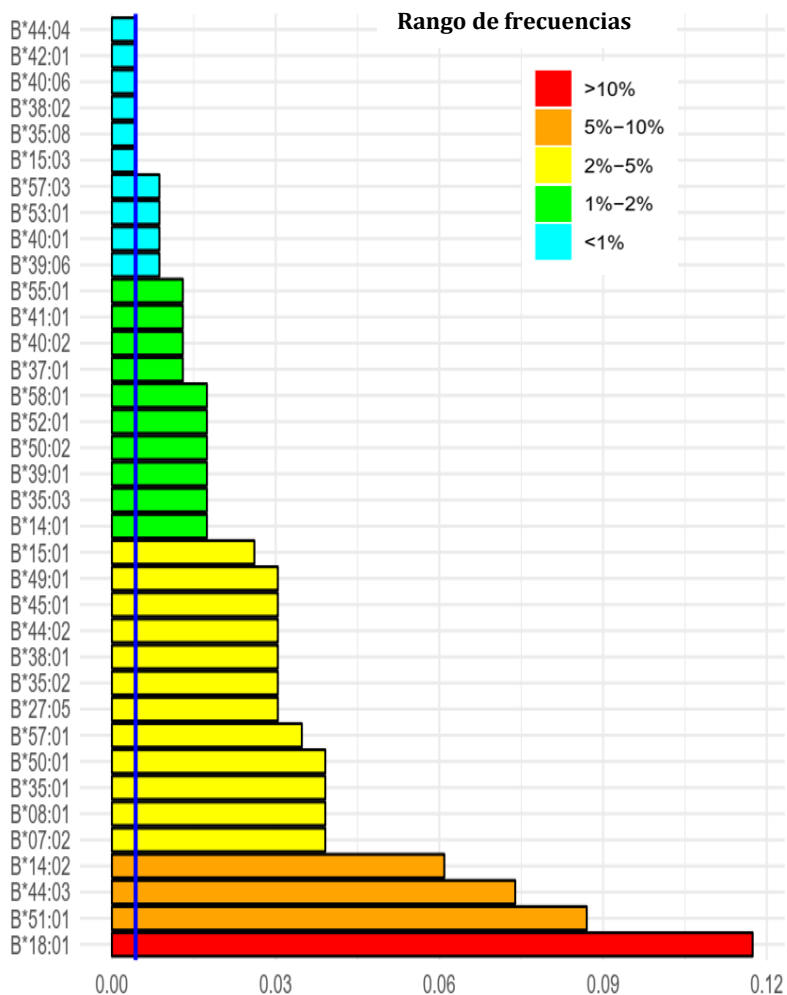


Heterocigosidad estimada: 0,9245

Test de equilibrio Hardy-Weinberg, p-valor: 0,2962085

**Tabla 15. Frecuencias alélicas halladas en los pacientes para el locus HLA-B.**

Alelo HLA-B	Frecuencia
B*18:01	0,1174
B*51:01	0,0870
B*44:03	0,0739
B*14:02	0,0609
B*35:01	0,0391
B*08:01	0,0391
B*50:01	0,0391
B*07:02	0,0391
B*57:01	0,0348
B*45:01	0,0304
B*44:02	0,0304
B*27:05	0,0304
B*38:01	0,0304
B*49:01	0,0304
B*35:02	0,0304
B*15:01	0,0261
B*58:01	0,0174
B*52:01	0,0174
B*14:01	0,0174
B*50:02	0,0174
B*39:01	0,0174
B*35:03	0,0174
B*45:01	0,0130
B*41:01	0,0130
B*37:01	0,0130
B*55:01	0,0130
B*40:02	0,0130
B*39:06	0,0087
B*40:01	0,0087
B*57:03	0,0087
B*53:01	0,0087
B*15:03	0,0043
B*38:02	0,0043
B*44:04	0,0043
B*42:01	0,0043
B*35:08	0,0043



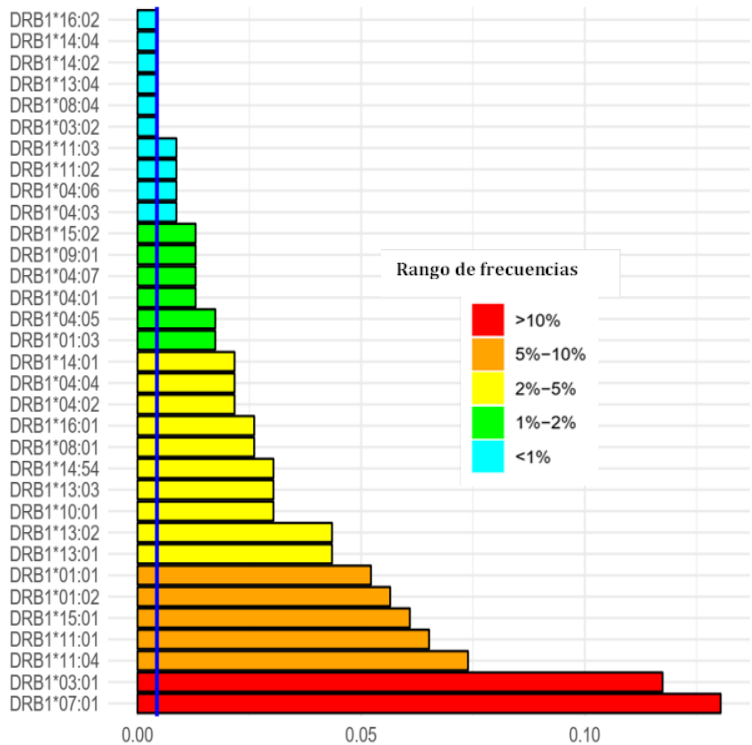
Heterocigosidad estimada: 0,9528

Test de equilibrio Hardy-Weinberg, p-valor: 0,9999

<i>B*40:06</i>	0,0043
<i>B*47:01</i>	0,0043
<i>B*15:10</i>	0,0043
<i>B*35:43</i>	0,0043
<i>B*41:02</i>	0,0043
<i>B*44:27</i>	0,0043
<i>B*73:01</i>	0,0043
<i>B*15:02</i>	0,0043
<i>B*13:02</i>	0,0043
<i>B*48:01</i>	0,0043
<i>B*35:10</i>	0,0043

Tabla 16. Frecuencias alélicas halladas en los pacientes para el locus *HLA-DRB1*.

Alelo <i>HLA-DRB1</i>	Frecuencia
<i>DRB1*07:01</i>	0,1304
<i>DRB1*03:01</i>	0,1174
<i>DRB1*11:04</i>	0,0739
<i>DRB1*11:01</i>	0,0652
<i>DRB1*15:01</i>	0,0609
<i>DRB1*01:02</i>	0,0565
<i>DRB1*01:01</i>	0,0522
<i>DRB1*13:02</i>	0,0435
<i>DRB1*13:01</i>	0,0435
<i>DRB1*14:54</i>	0,0304
<i>DRB1*13:03</i>	0,0304
<i>DRB1*10:01</i>	0,0304
<i>DRB1*16:01</i>	0,0261
<i>DRB1*08:01</i>	0,0261
<i>DRB1*14:01</i>	0,0217
<i>DRB1*04:02</i>	0,0217
<i>DRB1*04:04</i>	0,0217
<i>DRB1*04:05</i>	0,0174
<i>DRB1*01:03</i>	0,0174
<i>DRB1*04:07</i>	0,0130
<i>DRB1*09:01</i>	0,0130



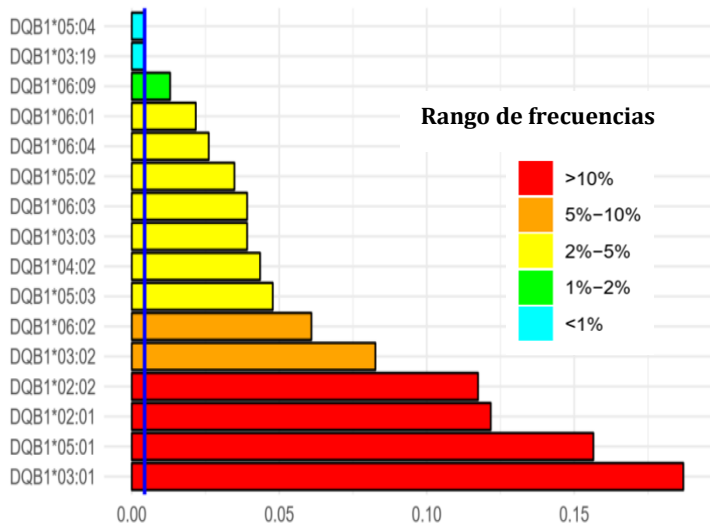
Heterocigosidad estimada: 0,9388

Test de equilibrio Hardy-Weinberg, p-valor: 0,1744302

DRB1*04:01	0,0130
DRB1*15:02	0,0130
DRB1*11:02	0,0087
DRB1*04:06	0,0087
DRB1*11:03	0,0087
DRB1*04:03	0,0087
DRB1*03:02	0,0043
DRB1*14:02	0,0043
DRB1*08:04	0,0043
DRB1*13:04	0,0043
DRB1*14:04	0,0043
DRB1*16:02	0,0043

**Tabla 17. Frecuencias alélicas halladas en los pacientes para el locus HLA-DQB1.**

Alelo HLA-DQB1	Frecuencia
DQB1*03:01	0,1870
DQB1*05:01	0,1565
DQB1*02:01	0,1217
DQB1*02:02	0,1174
DQB1*03:02	0,0826
DQB1*06:02	0,0609
DQB1*05:03	0,0478
DQB1*04:02	0,0435
DQB1*03:03	0,0391
DQB1*06:03	0,0391
DQB1*05:02	0,0348
DQB1*06:04	0,0261
DQB1*06:01	0,0217
DQB1*06:09	0,0130
DQB1*03:19	0,0043
DQB1*05:04	0,0043



Heterocigosidad estimada: 0,8916

Test de equilibrio Hardy-Weinberg, p-valor: 0,517804

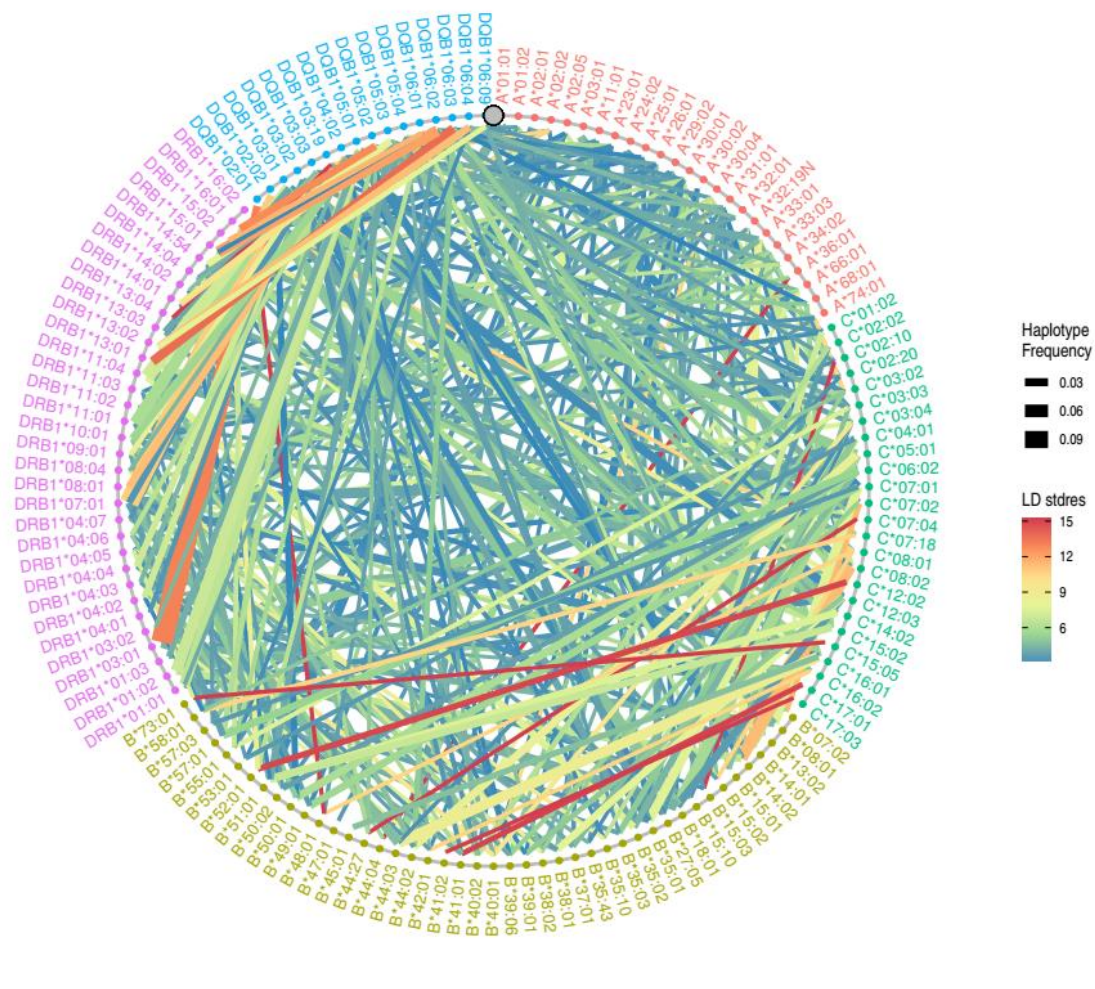
Todos los *loci* HLA analizados mostraron niveles de homocigosidad observada ( $F_o$ ) inferiores a la homocigosidad esperada bajo neutralidad ( $F_e$ ). Además, *HLA-C* y *-DQB1* son los únicos *loci* que muestran desviación estadísticamente significativa de la neutralidad ( $p < 0,05$ ) y, por lo tanto, una selección equilibrada más pronunciada ( $F_{nd} < 0$ ) (Tabla 18). No obstante, de los *loci* analizados todos tienden a la selección equilibrada ( $F_{nd} < 0$ ) y ninguno de los estudiados tiende a la selección direccional ( $F_{nd} > 0$ ) (Tabla 18).

**Tabla 18. Implementación del test de neutralidad Ewens-Watterson-Slatkin.**

<i>Locus HLA</i>	F observado ( $F_o$ )	F esperado ( $F_e$ )	Desviación normalizada de F ( $F_{nd}$ )	p valor de F
<i>A</i>	0,0872	0,1201	-0,8430	0,154
<i>C</i>	0,0755	0,1258	-1,2429	0,022
<i>B</i>	0,0472	0,0586	-0,8096	0,181
<i>DRB1</i>	0,0612	0,0901	-1,1061	0,052
<i>DQB1</i>	0,1084	0,2057	-1,3166	0,013

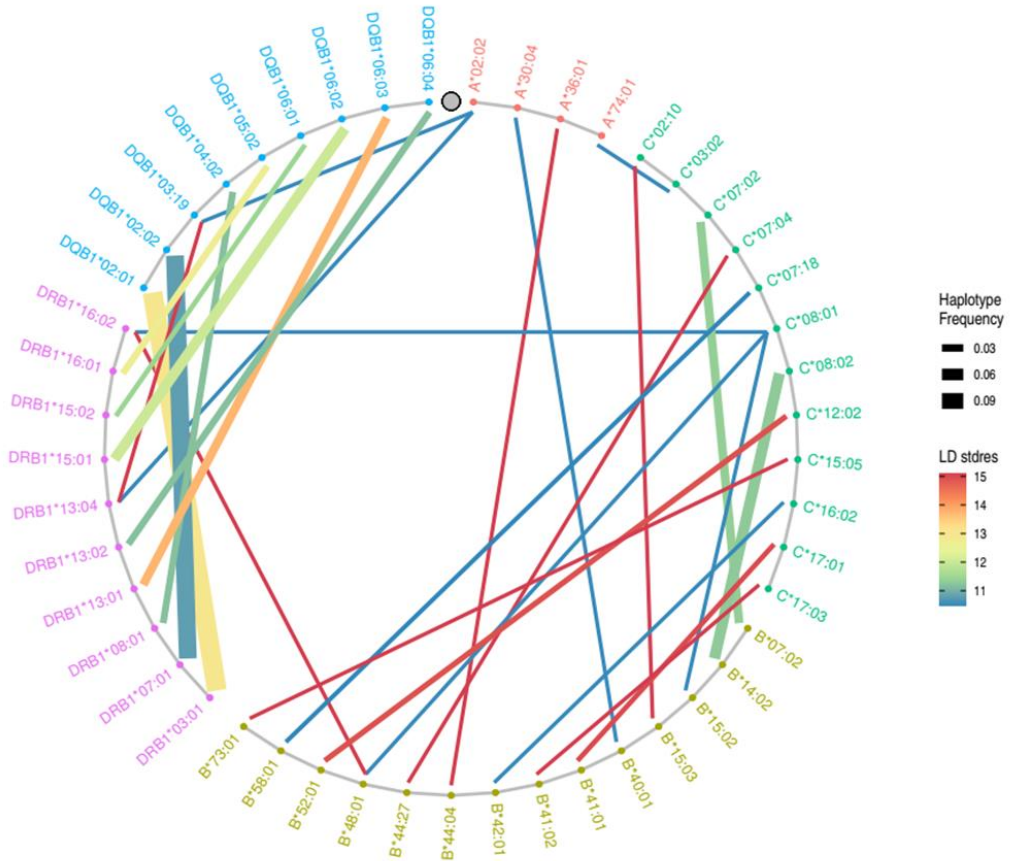
P valor para la desviación normalizada de F después de la corrección de Bonferroni.

**Figura 31. Representación de todos los disequilibrios de ligamiento significativos con stdres >3 y frecuencia haplotípica  $\geq 1$**



LD: *Linkage disequilibrium* (desequilibrio de ligamiento)

Stdres: *Standardized residual*



Con una frecuencia superior al 9% se encontraron las siguientes asociaciones HLA:

*DRB1\*07:01~DQB1\*02:02* (con desequilibrio de ligamiento positivo, *stdres* 11)

*DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (con desequilibrio de ligamiento positivo, *stdres* 13)

Con frecuencia superior al 6% se encontraron las siguientes asociaciones HLA:

*C\*08:02~B\*14:02* (con desequilibrio de ligamiento positivo, *stdres* 11,5)

*C\*07:02~B\*07:02* (con desequilibrio de ligamiento positivo, *stdres* 11,5)

*DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* (con desequilibrio de ligamiento positivo, *stdres* 12)

### 4.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO SOBRE ALORREACTIVIDAD NK Y GENOTIPO *KIR*

Respecto a datos descriptivos relacionados con la alorreactividad NK (Tabla 12), hubo 40 parejas D/R (35,4%) con predicción de alorreactividad según el **modelo Perugia** (incompatibilidad ligando-ligando). En la tabla 19 se resume el tipo de incompatibilidad hallada en cada caso y su frecuencia.

**Tabla 19. Predicción de alorreactividad según el modelo de Perugia.**

Potencial alorreactividad según modelo de Perugia	Total: 40, n (%)
<b>Incompatibilidad C2</b> Donante C1C2 vs. Receptor C1C1	8 (20%)
<b>Incompatibilidad C1</b> Donante C1C2 vs. Receptor C2C2	9 (22,5%)
<b>Incompatibilidad Bw4</b> Donante Bw4Bw6 vs. Receptor Bw6Bw6	6 (15%)
<b>Incompatibilidad A3/A11</b> Donante A3/A11 vs. Receptor A3/A11 negativo	9 (22,5%)
<b>Incompatibilidad en C2 y Bw4</b>	2 (5%)
<b>Incompatibilidad en C1 y Bw4</b>	3 (7,5%)
<b>Incompatibilidad en A3/A11 y Bw4</b>	3 (7,5%)

Del mismo modo, de las 94 parejas D/R (83,2%) con predicción de alorreactividad según el **modelo Memphis** (incompatibilidad receptor-ligando) el tipo de incompatibilidad se detalla en la tabla 20. La incompatibilidad más frecuente se debió a donante con gen *KIR3DL2* presente sin ligando HLA- A3 ni A11 en el receptor.



**Tabla 20. Predicción de alorreactividad según el modelo de Memphis.**

Potencial alorreactividad según modelo de Memphis	Total: 94, n(%)
Donante <i>KIR2DL1</i> sin C2 en receptor	7 (7,45%)
Donante <i>KIR2DL2/2DL3</i> sin C1 en receptor	9 (9,57%)
Donante <i>KIR3DL1</i> sin Bw4 en receptor	14 (14,89%)
Donante <i>KIR3DL2</i> sin A3 ni A11 en receptor	23 (24,47%)
Donante <i>KIR2DL2/2DL3</i> sin C1 en receptor y donante <i>KIR3DL2</i> sin A3 ni A11 en receptor	8 (8,51%)
Donante <i>KIR2DL1</i> sin C2 en receptor y donante <i>KIR3DL2</i> sin A3 ni A11 en receptor	17 (18,09%)
Donante <i>KIR3DL1</i> sin Bw4 en receptor y donante <i>KIR2DL2/2DL3</i> sin C1 en receptor	3 (3,19%)
Donante <i>KIR3DL1</i> sin Bw4 en receptor y donante <i>KIR2DL1</i> sin C2 en receptor	5 (5,32%)
Donante <i>KIR3DL1</i> sin Bw4 en receptor y donante <i>KIR3DL2</i> sin A3 ni A11 en receptor	6 (6,38%)
Donante <i>KIR3DL1</i> sin Bw4 en receptor, asociado con donante <i>KIR2DL2/2DL3</i> sin C1 en receptor y donante <i>KIR3DL2</i> sin A3 ni A11 en receptor	2 (2,13%)

En cuanto al modelo de **ausencia de ligando KIR en receptor** hubo alorreactividad NK en 74 parejas D/R (65,5%) (Tabla 12), debiéndose en la mayoría de los casos a ausencia de ligando C2 en el paciente (Tabla 21).

**Tabla 21. Modelo de ausencia de ligando-KIR en receptor.**

Ausencia de ligando KIR en receptor	Total: 74 (100%), n (%)
Ausencia Bw4	16 (21,62%)
Ausencia C1	17 (22,97%)
Ausencia C2	23 (31,08%)
Ausencia Bw4 y C1	6 (8,11%)
Ausencia Bw4 y C2	12 (16,22%)

Según el **modelo Nantes** (incompatibilidad KIR *gen-gen*), se observó predicción de alorreactividad en 71 casos (62,8%). La incompatibilidad más prevalente, por este modelo, fue por presencia del gen *KIR2DL5* en el paciente y su ausencia en el donante (dirección *HvG*). A continuación, se exponen los tipos de incompatibilidad, según este modelo (Tabla 22).

**Tabla 22. Predicción de alorreactividad según el modelo de Nantes.**

Incompatibilidad <i>KIR-KIR</i>	Total: 71, n(%)
Tipo de incompatibilidad y sentido	
<i>KIR2DL2 (HvG)</i>	10 (14,08%)
<i>KIR2DL3 (HvG)</i>	5 (7,04%)
<i>KIR2DL5 (HvG)</i>	12 (16,90%)
<i>KIR3DL1 (HvG)</i>	2 (2,82%)
<i>KIR2DS2 (HvG)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL1 y KIR2DL3 (HvG)</i>	7 (9,86%)
<i>KIR3DL1 y KIR2DL2 (HvG)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL2 y KIR2DL5 (HvG)</i>	4 (5,63%)
<i>KIR2DL2 (GvH)</i>	6 (8,45%)
<i>KIR2DL5 (GvH)</i>	10 (14,08%)
<i>KIR3DL1 (GvH)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL2 y KIR2DL5 (GvH)</i>	7 (9,86%)
<i>KIR2DL1, KIR2DL3 y KIR2DL5 (GvH)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL5 (HvG) y KIR2DL2 (GvH)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL3 (HvG) y KIR3DL1 (GvH)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL3 (HvG) y KIR2DL2 (GvH)</i>	1 (1,41%)
<i>KIR2DL2 (HvG) y KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL5 (GvH)</i>	1 (1,41%)

En los donantes, la distribución de frecuencias en función de genes *KIR-B* en centrómero y telómero se especifica en la tabla 23.

**Tabla 23. Distribución en el donante de tipo de centrómero y tipo de telómero.**

Tipo	Centrómero donante, n (%)	Telómero donante, n (%)
<b>AA</b>	52 (46%)	67 (59,3%)
<b>AB</b>	42 (37,2%)	41 (36,3)
<b>BB</b>	19 (16,8%)	5 (4,4%)

En las tablas 24 y 25 se describen los datos relacionados con el **modelo del haplotipo KIR o Standford** del que, a su vez, se deriva la puntuación de contenido de genes *KIR-B*. Según este modelo 43 parejas D/R (38,1%) cumplieron criterios de predicción de alorreactividad NK (Tabla 12). La categorización del donante como *Neutral* fue la más representada (Tabla 24) y lo mismo ocurrió con la obtención de *B-content score* de 1 (Tabla 25).

**Tabla 24. Predicción de alorreactividad según el modelo de Standford.**

Grupo KIR-B del donante	Donante, n (%)
<i>Neutral</i>	70 (61,9%)
<i>Better</i>	24 (21,2%)
<i>Best</i>	19 (16,9%)

NOTA: Los categorizados como *Neutral* se presuponen sin potencial alorreactividad NK. Por eso, según este modelo, se observó predicción de alorreactividad NK en 43 parejas D/R.

**Tabla 25. Puntuación del contenido genes *KIR-B* (*B-content score*).**

<i>B-content score</i>	Donante, n (%)
0	32 (28,3%)
1	38 (33,6%)
2	37 (32,7%)
3	5 (4,4%)
4	1 (0,9%)

El genotipo *KIR* más frecuente entre los donantes fue el 1 seguido del 2 y después del 4 con una representación del 28,3%, 12,4% y 10,6%, respectivamente (Tabla 26).

**Tabla 26. Frecuencia del genotipo *KIR* entre los donantes.**

<b>Genotipo Id del Donante</b>	<b>Frecuencia (Absolutos)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
1	32	28,3
2	14	12,4
3	9	8,0
4	12	10,6
5	7	6,2
6	3	2,7
7	4	3,5
9	1	0,9
10	1	0,9
12	2	1,8
14	2	1,8
19	2	1,8
20	1	0,9
38	1	0,9
69	2	1,8
71	5	4,4
72	7	6,2
73	1	0,9
75	2	1,8
76	1	0,9
81	1	0,9
91	1	0,9
118	1	0,9
429	1	0,9
<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>100,0</b>

Respecto a la caracterización *KIR* de la población de pacientes los genotipos más prevalentes fueron el 1 (23,9%), seguido del 4 (23%), y en tercer lugar el 2 (14,2%) (Tabla 27).

**Tabla 27. Frecuencia del genotipo *KIR* entre los receptores.**

<b>Genotipo Id del receptor</b>	<b>Frecuencia (Absolutos)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
1	27	23,9
2	16	14,2
3	4	3,5
4	26	23,0
5	9	8,0
6	6	5,3
7	4	3,5
8	3	2,7
9	3	2,7
12	4	3,5
13	1	0,9
14	2	1,8
68	1	0,9
69	1	0,9
71	1	0,9
72	2	1,8
75	1	0,9
81	1	0,9
400	1	0,9
<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>100,0</b>

Con respecto al contenido en genes *KIR-B* y los grupos de haplotipos *KIR*, la distribución de frecuencias en la población de pacientes fue la detallada en la tabla 28.

**Tabla 28. Tipo de centrómero y telómero en los pacientes.**

Tipo	Centrómero receptor, n (%)	Telómero receptor, n (%)
AA	50 (44,2%)	64 (56,6%)
AB	59 (52,2%)	45 (39,8)
BB	4 (3,5%)	4 (3,5%)

Aplicando en los pacientes, la distribución de frecuencias en la categorización en los grupos *Neutral*; *Better* y *Best* y la puntuación obtenida mediante *B-content score* se pormenoriza en las tablas 29 y 30 respectivamente.

**Tabla 29. Clasificación de receptores en: *Neutral*; *Better* y *Best*.**

Grupo KIR B	Receptor, n (%)
<i>Neutral</i>	83 (73,5%)
<i>Better</i>	27 (23,9%)
<i>Best</i>	3 (2,7%)

**Tabla 30. *B-content score* de los receptores.**

<i>B-content score</i>	Receptor, n (%)
0	27 (23,9%)
1	55 (48,7%)
2	29 (25,7%)
3	1 (0,9%)
4	1 (0,9%)

Finalmente comparando los grupos de haplotipos KIR entre donante y receptor, las frecuencias observadas se detallan en la tabla 31. El genotipo *KIR* de tipo AB fue el más frecuente (70,8% de los donantes y 75,2% de los pacientes).

**Tabla 31. Grupos de haplotipos KIR entre donante y receptor.**

	Genotipo <i>KIR</i>	Donante, n (%)	Receptor, n (%)
AA	AA	32 (28,3%)	27 (23,9%)
	AB	80 (70,8%)	85 (75,2%)
Bx	BB	1 (0,9%)	1 (0,9%)

#### **4.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE: INJERTO, EICR, RECAÍDA, MNRR, SLE Y SG**

En cuanto al injerto hematopoyético, un 4,4% presentó fallo de injerto primario sin relación aparente con la presencia de ADE pre-TPH en el receptor. El 92,9% de los pacientes alcanzó el injerto de neutrófilos y el 85,8% el injerto de plaquetas. El injerto mieloide se produjo a una mediana de 18 días (neutrófilos) y 28 días (plaquetas) tras la infusión de PH. Más de la mitad de los pacientes (51,3%) desarrollaron fiebre alorreactiva (Tabla 32).

La IA de EICRa I-IV, II-IV y III-IV a 145 días de la infusión de PH fue de 57% (47%-66%), 36% (27%-46%) y 12% (6%-18%), respectivamente.

En cuanto a la EICRc, 16 pacientes (14,16%) la desarrollaron. En el 25% fue leve, en el resto moderada o grave. Asimismo, en el 50% de los casos fue extensiva, en el 43,75% limitada y de un paciente se desconocía este dato. La IA de EICRc a los 6 meses fue del 8% (3%-15%), a los 12 meses del 26% (17%-35%) y a los 18 meses del 27% (18%-37%).

La IA de recaída fue del 12% (7%-19%) a los 12 meses y del 19% (11%-27%) a los 18 meses.

La IA de MNRR fue del 17% (11%-24%) a los 100 días, del 22% (15%-30%) a los 6 meses y del 28% (20%-36%) tanto al año como a los 18 meses postrasplante.

La mediana de SLE fue de 22,5 meses. A los 12 y 18 meses el 60% (52%-70%) y el 54% (45%-64%) de los pacientes se mantuvieron vivos y sin recaída, respectivamente (Figura 32).

Respecto a la SG, fue del 66% (58%-76%) a los 12 meses y del 61% (53%-72%) a los 18 meses, con una mediana de SG de 29,4 meses (Figura 33).

**Tabla 32. Resultados postrasplante.**

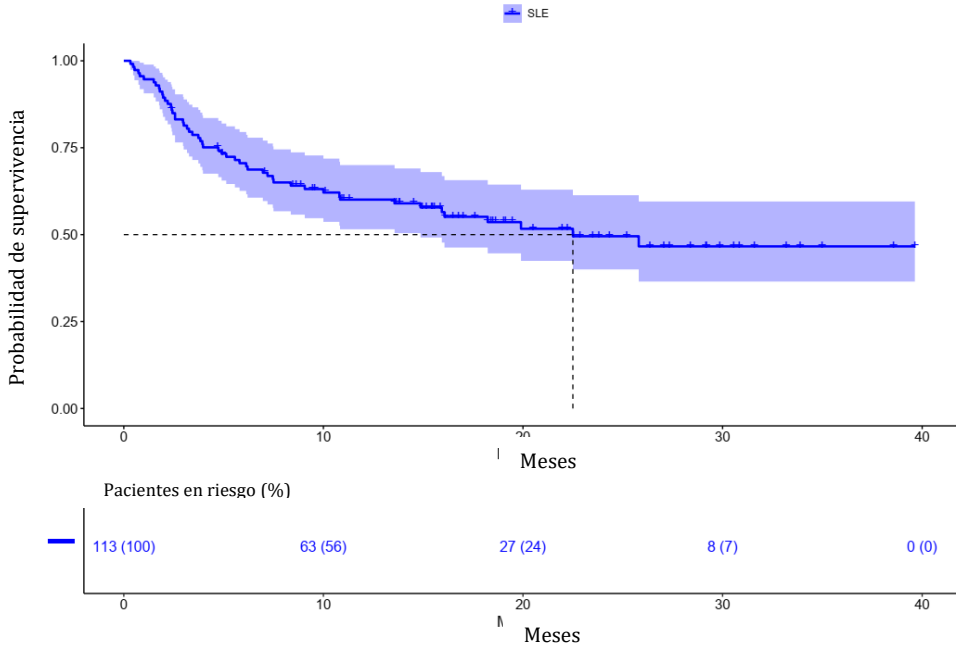
<b>RESULTADOS POSTRASPLANTE</b>	
<b>Fallo de injerto primario, n (%)</b>	5 (4,4%)
<b>Injerto de neutrófilos, n (%)</b>	
Sí	105 (92,9%)
No	7 (6,2%)
Desconocido	1 (0,9%)
<b>Injerto de plaquetas, n (%)</b>	
Sí	97 (85,8%)
No	16 (14,2%)
<b>Mediana de injerto mieloide, días (rango)</b>	
Neutrófilos > 0,5x10 <sup>9</sup> /L	Mediana 18; Rango (2-37)
Plaquetas > 20 x10 <sup>9</sup> /L	Mediana 28; Rango (11-260)
<b>Fiebre alorreactiva, n (%)</b>	
No	42 (37,2%)
Sí	58 (51,3%)
Desconocido	13 (11,5%)
<b>EICR aguda, n (%)</b>	
Grado I-IV	60(53,1%)
Grado II-IV	39 (34,5%)
Grado III-IV	14 (12,4%)
<b>IA EICRa I-IV., % (I.C. 95%)</b>	57% (47%-66%)
<b>IA EICRa II-IV, % (I.C. 95%)</b>	36% (27%-46%)
<b>IA EICRa III-IV, % (I.C. 95%)</b>	12% (6%-18%)
<b>IA EICRc, % (I.C. 95%)</b>	
6 meses	8% (3%-15%)
12 meses	26% (17%-35%)
17,5 meses	27% (18%-37%)
<b>IA MNRR, % (I.C. 95%)</b>	
En día +100	17% (11%-24%)
En día +180	22% (15%-30%)
A 1 año	28% (20%-36%)
<b>IA de recaída a 1 año, % (I.C.95%)</b>	12% (7%-19%)
<b>SG a un año, % (I.C. 95%)</b>	66% (58%-76%)
<b>SLE a un año, % (I.C. 95%)</b>	60% (52%-70%)
<b>Mediana SLE, meses (rango)</b>	22,79 meses (19-47-26,11)
<b>Mediana de SG, meses (rango)</b>	24,73 meses (21,41-28,05)



**RESULTADOS POSTRASPLANTE**

**Mediana de seguimiento, meses (rango)** 14,38 meses (0,30-39,60)

**Abreviaturas:** EICRa/EICRC: enfermedad injerto contra receptor aguda/crónica; IA: Incidencia acumulada; I.C.: intervalo de confianza; MNRR: mortalidad no relacionada con la recaída; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad



**Figura 32. Supervivencia libre de enfermedad (Kaplan Meier).**

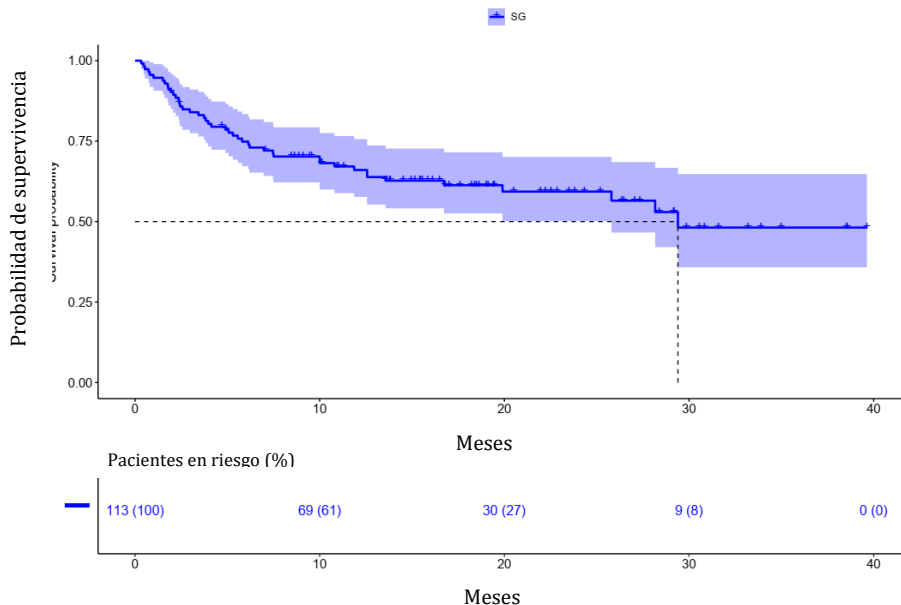


Figura 33. Supervivencia global (Kaplan Meier).

#### 4.5. ANÁLISIS UNIVARIABLE Y MULTIVARIABLE DE FACTORES DE RIESGO DE LOS DIFERENTES EVENTOS DE INTERÉS:

A continuación se resumen los resultados del análisis univariable, que alcanzaron la significación estadística (“p” valor  $\leq 0,05$ ), en cuanto a la presencia de alorreactividad NK entre D/R predicha según los distintos modelos propuestos (ligando-ligando, receptor-ligando, ausencia de ligando KIR en receptor, *KIR-KIR*, haplotipo KIR y *B-content score*) así como el resto de variables y su impacto en los diferentes eventos post-TPH. Del mismo modo, dentro de cada evento de interés se incluyen los hallazgos observados en los diferentes análisis multivariados. En el anexo XI se detallan los resultados de la totalidad de los parámetros en la secuencia temporal completa.

## 4.5.1. EICR

### 4.5.1.1. EICR aguda grado I-IV

Respecto a la EICRa I-IV, no se identificó ninguna condición asociada estadísticamente a este evento.

En la tabla 33 se muestran los resultados cuyo valor de “p” bilateral fue  $\leq 0,1$  y que finalmente fueron incluidos en el análisis multivariable. Las variables seleccionadas mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*), en el análisis multivariable, se recogen en la tabla 34.

**Tabla 33. Análisis univariable de EICRa I-IV.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	EICR aguda grado I-IV			p value
	20 días IA % (I.C 95%)	60 días IA % (I.C 95%)	140 días IA % (I.C 95%)	
<b>LMA vs. resto</b>				
<b>LMA</b>	2,86 (0,21-12,89)	34,05 (18,29-50,50)	46,61 (28,53-62,84)	0,100
<b>Distinto de LMA</b>	7,86 (3,18-15,32)	49,25 (37,42-60,03)	59,83 (47,35-70,26)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>				
<b>Remisión completa</b>	8,21 (2,59-18,10)	36,38 (22,75-50,13)	47,84 (32,59-61,59)	0,056
<b>Remisión parcial</b>	8,57 (2,15-20,78)	62,86 (44,25-76,76)	71,71 (52,85-84,09)	
<b>Enfermedad activa</b>	0,00 (NaN-NaN)	34,41 (16,96-52,66)	49,06 (26,85-68,01)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>				
<b>D-/R+</b>	4,17 (0,28-17,99)	70,94 (49,96-86,29)	76,75 (49,20-90,60)	0,066
<b>Resto (+/+; +/-; -/-)</b>	6,93 (2,81-13,59)	38,34 (28,07-48,51)	51,03 (39,71-61,26)	
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>				
<b>No</b>	5,48 (1,76-12,41)	39,66 (28,16-50,91)	51,01 (38,33-62,34)	0,093
<b>Sí</b>	8,04 (2,02-19,62)	54,02 (36,48-68,65)	65,05 (46,87-78,35)	
<b>Gen 2DS2 en donante</b>				
<b>No</b>	3,71 (0,67-11,39)	53,78 (39,18-66,32)	68,10 (52,99-79,26)	0,061
<b>Sí</b>	8,77 (3,20-17,91)	35,89(23,45-48,48)	44,01 (30,35-56,84)	
<b>Fuente de progenitores</b>				
<b>Sangre periférica</b>	7,25 (3,18-13,58)	46,96 (36,50-56,72)	58,81 (47,79-68,27)	0,088
<b>Médula ósea</b>	0,00 (NaN-NaN)	28,57 (8,23-53,35)	35,71 (12,20-60,41)	

**Tabla 34. Análisis multivariable de EICRa I-IV.**

<b>EICR aguda grado I-IV</b>		
	<b>Hazard Ratio</b>	<b>p value</b>
<b>LMA vs. resto</b>		
LMA	1	
Distinto de LMA	1,58 (0,87-2,86)	0,131
<b>CMV estado serológico D/R</b>		
D-/R+	1	
Resto (+/+; +/-; -/-)	0,57 (0,31-1,02)	0,058
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>		
No	1	
Sí	1,56 (0,93-2,60)	0,092
<b>Fuente de progenitores</b>		
Sangre periférica	1	
Médula ósea	0,43 (0,17-1,08)	0,073

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### **4.5.1.2. EICR aguda grado II-IV**

El análisis univariable, mostró un impacto estadísticamente significativo de la compatibilidad serológica D/R frente al CMV sobre el desarrollo de EICRa grado II-IV. Aquellas parejas con D negativo/R positivo, presentaron mayor riesgo de EICRa grado II-IV (IA 57,09% frente al 30,15% en aquellas parejas D/R con cualquier otra combinación serológica frente a CMV entre D/R, p=0,040). Del mismo modo, la edad del donante (mayor a 40 años) se asoció con mayor riesgo de EICRa II-IV (IA 47,29% vs. 27,85%, p=0,029). A su vez, se objetivó que el AIR supuso un mayor riesgo de EICRa II-IV (IA de 41,77% vs. IA 19,78%, p=0,049). Por último, esta complicación se dio con mayor frecuencia si la fuente de PH era SP frente a MO (IA 39,64% vs. 7,14%, p=0,023) (Tabla 35).

**Tabla 35. Análisis univariable de EICRa II-IV.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	EICR aguda grado II-IV			
	20 días	60 días	140 días	p value
	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	
<b>LMA vs. resto</b>				
<b>LMA</b>	0,00 (NaN-NaN)	16,04 (5,72-31,02)	26,12 (12,09-42,60)	0,097
<b>Distinto de LMA</b>	6,56 (2,41-13,65)	33,22 (22,82-43,96)	39,14 (27,92-50,17)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>				
<b>D-/R+</b>	4,17 (0,28-17,99)	51,72 (28,26-70,89)	57,09 (32,40-75,66)	0,040
<b>Resto (+/+; +/-; -/-)</b>	4,69 (1,51-10,72)	22,34 (14,15-31,71)	30,15 (20,57-40,29)	
<b>Edad donante &lt;40 años</b>				
<b>No</b>	2,44 (0,18-11,18)	36,59 (22,08-51,21)	47,29 (30,99-61,96)	0,029
<b>Sí</b>	5,86 (1,88-13,22)	22,71 (13,43-33,47)	27,85 (17,44-39,23)	
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>				
<b>No</b>	2,78 (0,52-8,71)	24,42 (15,03-35,05)	31,15 (20,39-42,52)	0,094
<b>Sí</b>	8,04 (2,02-19,62)	35,09 (20,13-50,44)	43,33 (26,94-58,67)	
<b>Régimen de acondicionamiento</b>				
<b>Intensidad reducida</b>	2,55 (0,48-8,03)	33,05 (22,68-43,76)	41,77 (30,30-52,82)	0,049
<b>Mieloablatoivo</b>	9,68 (2,40-23,17)	16,13 (5,76-31,16)	19,78 (7,83-35,65)	
<b>Fuente de progenitores</b>				
<b>Sangre periférica</b>	5,25 (1,94-11,06)	31,22 (22,05-40,81)	39,64 (29,45-49,65)	0,023
<b>Médula ósea</b>	0,00 (NaN-NaN)	7,14 (0,39-28,49)	7,14 (0,39-28,49)	

Referente a EICRa II-IV, el análisis multivariable mostró que cualquier situación distinta a la de donante seronegativo para CMV con receptor seropositivo, se asoció a menor incidencia de esta complicación (HR 0,44, p=0,023). Del mismo modo, el donante joven (menor de 40 años) también mostró un efecto protector frente al desarrollo de EICRa II-IV (HR 0,46, p=0,016) al igual que la MO como fuente de PH (HR 0,13, p= 0,044) (Tabla 36).

**Tabla 36. Análisis multivariable de EICRa II-IV.**

	EICR aguda grado II-IV	
	Hazard Ratio	p value
<b>CMV estado serológico D/R</b>		
D-/R+	1	
Resto (+/+; +/-; -/-)	0,44 (0,22-0,89)	0,023
<b>Donante &lt;40 años</b>		
No	1	
Sí	0,46 (0,24-0,86)	0,016

EICR aguda grado II-IV		
<b>Régimen de acondicionamiento</b>		
Intensidad reducida	1	
Mieloablativo	0,52 (0,23-1,18)	0,120
<b>Fuente de progenitores</b>		
Sangre periférica	1	
Médula ósea	0,13 (0,02-0,94)	0,044

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### 4.5.1.3. EICR aguda grado III-IV

El análisis univariable mostró que el estado de respuesta de la enfermedad de base en el momento del TPH tuvo un impacto en la IA de EICRa III-IV, con una menor IA de EICRa III-IV en los pacientes en RC (3,92% vs. 17,88%, p=0,022). Específicamente, desarrollaron el evento el 3,92% de los pacientes en RC; el 14,29% de pacientes en RP y en casos de enfermedad activa el 22,42%, p=0,045 (Tabla 37). Sin embargo, en el análisis multivariable, ninguna de las variables alcanzó la significación estadística (Tabla 38).

**Tabla 37. Análisis univariable de EICRa III-IV.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	EICR aguda grado III-IV			p value
	20 días	60 días	140 días	
	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>				
≤59 años	1,64 (0,13-7,80)	4,92 (1,28-12,47)	6,59 (2,10-14,75)	0,076
≥60 años	0,00 (NaN-NaN)	15,43 (7,15-26,61)	17,45 (8,52-29,02)	
<b>LMA vs. resto</b>				
LMA	0,00 (NaN-NaN)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	0,051
Distinto de LMA	1,28 (0,11-6,22)	12,82 (6,53-21,30)	15,49 (8,45-24,47)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>				
Remisión completa	1,96 (0,15-9,18)	1,96 (0,15-9,18)	3,92 (0,71-12,01)	0,045
Remisión parcial	0,00 (NaN-NaN)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	18,52 (6,57-35,19)	22,42 (8,84-39,79)	
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>				
Remisión completa	1,96 (0,15-9,18)	1,96 (0,15-9,18)	3,92 (0,71-12,01)	0,022
Distinto de remisión completa	0,00 (NaN-NaN)	16,16 (8,25-26,42)	17,88(9,47-28,44)	

<b>CMV estado serológico D/R</b>				
D-/R+	4,17 (0,28-17,99)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	0,091
Resto (+/+; +/-; -/-)	0,00 (NaN-NaN)	6,74 (2,74-13,25)	9,02 (4,19-16,13)	
<b>Compatibilidad HLA GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>				
5/10	1,64 (0,13-7,79)	4,92 (1,28-12,47)	6,59 (2,10-14,75)	0,077
≥6/10	0,00 (NaN-NaN)	15,39 (7,13-26,54)	17,36 (8,48-28,87)	

Tabla 38. Análisis multivariable de EICRa III-IV.

	EICR aguda grado III-IV	
	Hazard Ratio	p value
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>		
≤59 años	1	
≥60 años	3,14 (0,96-10,20)	0,057
<b>LMA vs. resto</b>		
LMA	1	
Distinto de LMA	6,59 (0,85-51,06)	0,071
<b>CMV estado serológico D/R</b>		
D-/R+	1	
Resto (+/+; +/-; -/-)	0,42 (0,14-1,26)	0,122
<b>Compatibilidad HLA (A, B, C, DRB1, DQB1) GvH,</b>		
5/10	1	
≥6/10	2,46 (0,82-7,43)	0,109

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### 4.5.1.4. EICR crónica

Ninguna de las variables analizadas demostró influencia estadísticamente significativa en el desarrollo EICRc (Anexo XI).

#### 4.5.2. Recaída

Respecto a la IA de recaída, en el análisis univariable, esta fue mayor en pacientes con enfermedad mieloide vs. otros diagnósticos (IA 27,26% vs. 6,01%,  $p=0,045$ ). También se observó mayor riesgo de recaída cuando la pareja D/R era a expensas de donante mujer y receptor varón (IA 34,05% vs. 15,56%,  $p=$

0,041). Además, en los pacientes con enfermedad avanzada la IA fue superior que en aquellos con enfermedad en estadios precoz o intermedio (IA 42,86%, 21,7%, 12,05%, respectivamente,  $p=0,039$ ) (Tabla 39).

**Tabla 39. Análisis univariable de recaída.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	RECAÍDA			p value
	6 meses IA % (I.C 95%)	12 meses IA % (I.C 95%)	29 meses IA % (I.C 95%)	
<b>Enfermedad de base (dos grupos)</b>				
LA+Patología mieloide	7,75 (3,14-15,13)	14,63 (7,72-23,66)	27,26 (16,07-39,70)	0,045
Patología linfoide+otros	6,01 (1,02-17,81)	6,01 (1,02-17,81)	6,01 (1,02-17,81)	
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>				
Estadio precoz	2,27 (0,17-10,52)	7,13 (1,79-17,66)	21,70 (9,03-37,89)	0,039
Estadio intermedio	5,73 (1,47-14,39)	9,85 (3,55-20,00)	12,05 (4,80-22,88)	
Estadio avanzado	27,62 (7,52-52,75)	35,24 (10,88-61,23)	42,86 (14,56-68,89)	
<b>Donante varón</b>				
No (Mujer)	15,73 (5,60-30,53)	22,60 (9,71-38,74)	34,05 (14,69-54,59)	0,041
Sí (Varón)	3,83 (1,01-9,88)	7,89 (3,18-15,41)	15,56 (7,75-25,84)	

En el análisis multivariable, el estadio de la enfermedad pretrasplante (avanzado) se asoció con mayor riesgo de recaída (HR 6,80,  $p=0,007$ ). En cambio, la compatibilidad HLA dirección  $GvH \geq 6/10$  resultó proteger de la misma (HR 0,23,  $p=0,012$ ) (Tabla 40).

**Tabla 40. Análisis multivariable de recaída.**

Variables	RECAÍDA	
	Hazard Ratio	p value
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	1	
Estadio intermedio	1,05(0,31-3,58)	0,935
Estadio avanzado	6,80 (1,70-27,24)	0,007
<b>Donante varón</b>		
No (Mujer)	1	
Sí (Varón)	0,43 (0,16-1,11)	0,080



Variables	RECAÍDA	
<b>B-content score donante</b>	1	
0	2,46 (0,72-8,49)	0,153
1	0,64 (0,19-2,14)	0,466
2+3+4		
<b>Compatibilidad HLA dirección GvH</b>		
<i>(A, B, C, DRB1, DQB1)</i>		
5/10	1	
≥6/10	0,23 (0,07-0,73)	0,012

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### 4.5.3. MNRR

La variable que mostró incremento del riesgo de MNRR fue tener la hemopatía de base en situación de enfermedad activa en comparación con aquellos en respuesta (RC y RP) (49,82% vs. 28,29%,  $p=0,022$ ). Por el contrario, la compatibilidad HLA GvH 5/10, “*half-matched*”, mostró una menor MNRR en comparación con aquellas parejas con compatibilidad HLA en sentido GvH  $\geq 5/10$  (IA 22,16% vs. 44,59%,  $p=0,017$ ). Considerando la alorreactividad NK, en función de los distintos modelos de predicción, el grupo cuyo KIR-B donante era “*Neutral*” presentó menor IA de MNRR que el grupo compuesto por donantes clasificados como “*Better o Best*” (23,03% vs. 50,47%  $p=0,004$ ). En particular, la IA de MNRR de los pacientes cuyo donante pertenecía a los grupos KIR-B *Neutral*, *Better* y *Best* fue 23,03%, 52,38% y 43,32%, respectivamente ( $p=0,016$ ). Asimismo, al contrastar los valores de la puntuación obtenida con *B-content score* del donante de 0, 1, o  $\geq 2$ , la IA de MNRR fue de 18,45%, 25,60% o 50,47%, respectivamente ( $p=0,016$ ). Además, si el telómero del donante era AA también se dio menor incidencia de MNRR frente a aquellos catalogados como AB (IA 21,09 % vs. 50,16%,  $p=0,021$ ). A destacar que la IA de MNRR fue del 14,98% cuando el genotipo *KIR* del receptor era AA vs. el 39,81% de los pacientes con genotipo *KIR* Bx aunque no alcanzó la significación estadística ( $p=0,059$ ) (Tabla 41).

**Tabla 41. Análisis univariable de la MNRR.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

VARIABLES	MNRR			p value
	3 meses	12 meses	29 meses	
	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	IA % (I.C 95%)	
<b>LMA vs. resto</b>				
<b>LMA</b>	11,43 (3,54-24,45)	17,14 (6,84-31,37)	17,14 (6,84-31,37)	0,072
<b>Distinto de LMA</b>	19,29 (11,38-28,77)	32,82 (22,48-43,53)	39,52 (26,27-52,48)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>				
<b>Respuesta (RC+RP)</b>	13,98 (7,63-22,22)	21,13 (13,16-30,37)	28,29 (16,41-41,40)	0,022
<b>Enfermedad activa</b>	25,93 (11,22-43,47)	49,82 (28,86-67,66)	49,82 (28,86-67,66)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>				
<b>Remisión completa</b>	13,73 (5,97-24,68)	19,66 (10,05-31,62)	23,54 (12,01-37,27)	0,065
<b>Remisión parcial</b>	14,47 (5,18-28,31)	23,55 (10,89-38,94)	41,16 (9,07-72,01)	
<b>Enfermedad activa</b>	25,93 (11,22-43,47)	49,82 (28,86-67,66)	49,82 (28,86-67,66)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>				
<b>D-/R+</b>	25,00 (9,89-43,58)	38,87 (19,05-58,36)	58,56 (12,78-87,01)	0,079
<b>Resto (+/+; +/-; -/-)</b>	14,61 (8,20-22,78)	24,94 (16,43-34,38)	27,15 (17,87-37,26)	
<b>Compatibilidad HLA GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>				
<b>5/10</b>	9,83 (3,97-18,89)	18,28 (9,68-29,04)	22,16 (11,47-35,04)	0,017
<b>≥6/10</b>	25,10 (14,22-37,54)	39,04 (25,63-52,21)	44,59 (27,88-60,01)	
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>				
<b>No (Neutral)</b>	11,43 (5,31-20,15)	18,65 (10,49-28,62)	23,03 (12,11-36,01)	0,004
<b>Sí (Better+ Best)</b>	25,65 (13,68-39,44)	43,10 (27,59-57,68)	50,47 (29,72-68,02)	
<b>Telómero donante</b>				
<b>AA</b>	11,94 (5,54-20,99)	21,09 (12,18-31,65)	21,09 (12,18-31,65)	0,021
<b>AB</b>	21,95 (10,75-35,67)	35,01 (20,53-49,86)	50,16 (25,42-70,64)	
<b>BB</b>	40,00 (3,06-78,61)	60,00 (4,79-91,77)	NA	
<b>B-content score donante</b>				
<b>0</b>	9,38 (2,33-22,53)	18,75 (7,46-33,97)	18,45 (7,46-33,97)	0,016
<b>1</b>	13,16 (4,73-25,98)	18,60 (8,05-32,53)	25,60 (10,17-44,39)	
<b>2+3+4</b>	25,65 (13,68-39,44)	43,10 (27,59-57,68)	50,47 (29,72-68,02)	
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>				
<b>Neutral</b>	11,43 (5,31-20,15)	18,65 (10,49-28,62)	23,03 (12,11-36,01)	0,016
<b>Better</b>	20,83 (7,36-38,95)	42,56 (22,05-61,71)	52,38 (24,94-74,00)	
<b>Best</b>	31,98 (12,52-53,50)	43,32 (19,99-64,74)	43,32 (19,99-64,74)	
<b>Genotipo KIR receptor</b>				
<b>AA</b>	11,11 (2,72-26,21)	14,98 (4,56-31,14)	14,98 (4,56-31,14)	0,059
<b>Bx(AB+BB)</b>	18,64 (11,20-27,55)	31,85 (22,18-41,94)	39,81 (25,79-53,47)	

Referente a la MNRR, el hecho de desarrollar EICRa III-IV fue factor de riesgo mientras que el desarrollo de EICRc fue un factor de protección (Tabla 42).

**Tabla 42. Variables tiempo-dependientes en la MNRR.**

	MNRR	
	Hazard Ratio	p value
EICR aguda I-IV	0,94 (0,45-1,95)	0,858
EICR agudo II-IV	1,80 (0,87-3,72)	0,115
ECIR agudo III-IV	7,87 (3,93-15,76)	<0,000= 6,05 <sup>-9</sup>
EICR crónica	3,15 <sup>-8</sup> (1,40-7,09)	<0,000= 2,00 <sup>-16</sup>

En el análisis multivariable, los principales resultados respecto a MNRR fueron que la enfermedad en estadio avanzado se asoció con incremento del riesgo (HR 16,34, p=0,001). En cambio, la situación de RC pre-TPH se comportó como factor protector (HR 0,20, p=0,035) (Tabla 43).

**Tabla 43. Análisis multivariable de MNRR.**

Variables	MNRR	
	Hazard Ratio	p value
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	1	
Estadio intermedio	0,72 (0,24-2,16)	0,561
Estadio avanzado	16,34 (3,05-87,50)	0,001
<b>Remisión completa</b>		
No	1	
Sí	0,20 (0,04-0,89)	0,035

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### 4.5.4. SLE

Las variables que, en el análisis univariable, se asociaron con peor SLE fueron: enfermedad avanzada (HR 3,91; p<0,001); enfermedad activa (HR 2,16,

p=0,015); grupo KIR-B donante (*Better+Best*) (HR 1,91, p=0,021), concretamente si el donante pertenecía al grupo KIR-B correspondiente a “*Best*” (HR 2,05, p=0,046) ; *B-content score* del donante  $\geq 2$  (HR 2,11, p=0,036); telómero del donante de tipo BB (HR 4,36, p=0,007); receptores cuyo *B-content score* era  $\geq 2$  (HR 2,70 , p=0,024); pacientes con genotipo Bx (AB o BB) (HR 2,16, p=0,047) ; D/R ambos con genotipo *KIR* de tipo AB (HR 3,34, p=0,046); fallo de injerto primario (HR 3,09, p=0,017) y EICRa III-IV (HR 3,93 p<0,001)( Tabla 44).

**Tabla 44. Variables con posible impacto en la SLE. Análisis univariable.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	SLE (29 meses)		
	Absoluto (%)	Hazard Ratio	p value
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>			
Estadio precoz	44 (38,9)	1	
Estadio intermedio	54 (47,8)	1,26 (0,67-2,39)	p=0,474
Estadio avanzado	15 (13,3)	3,91 (1,85-8,24)	p<0,001
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>			
Remisión completa	51 (45,1)	1	
Remisión parcial	35 (31,0)	0,75 (0,36-1,55)	p=0,441
Enfermedad activa	27 (23,9)	2,16 (1,16-4,00)	p=0,015
<b>CMV estado serológico D/R</b>			
D-/R+	24 (21,2)	1	
Resto (+/+; +/-; -/-)	89 (78,8)	0,56 (0,30-1,04)	p=0,065
<b>Donante varón</b>			
No (Mujer)	33 (29,2)	1	
Sí (Varón)	80 (70,8)	0,60 (0,34-1,06)	p=0,078
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>			
No ( <i>Neutral</i> )	70 (61,9)	1	
Sí ( <i>Better+ Best</i> )	43 (38,1)	1,91 (1,10-3,31)	p=0,021
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>			
<i>Neutral</i>	70 (61,9)	1	
<i>Better</i>	24 (21,2)	1,81 (0,94-3,51)	p=0,077
<i>Best</i>	19 (16,8)	2,05 (1,01-4,14)	p=0,046
<b>Telómero donante</b>			
AA	67 (59,3)	1	
AB	41 (36,3)	1,37 (0,77-2,43)	p=0,286
BB	5 (4,4)	4,36 (1,50-12,65)	p=0,007
<b><i>B-content score</i> donante</b>			
0	32 (28,3)	1	
1	38 (33,6)	1,20 (0,57-2,53)	p=0,638
2+3+4	43 (38,1)	2,11 (1,05-4,24)	p=0,036

Variables	SLE (29 meses)		
<b>Genotipo KIR receptor</b>			
AA	27 (23,9)	1	p=0,047
Bx(AB+BB)	86 (76,1)	2,16 (1,01-4,60)	
<b>B-content score receptor</b>			
0	27 (23,9)	1	p=0,099 p=0,024
1	55 (48,7)	1,94 (0,88-4,28)	
2+3+4	31 (27,4)	2,70 (1,14-6,37)	
<b>Fallo de injerto primario</b>			
No	108 (95,6)	1	p=0,017
Sí	5 (4,4)	3,09 (1,23-7,81)	
<b>Fallo de injerto primario en neutrófilos</b>			
No	108 (95,6)	1	p=0,017
Sí	5 (4,4)	3,09 (1,23-7,81)	
<b>Injerto neutrófilos</b>			
No	7 (6,2)	1	p<0,001
Sí	106 (93,8)	0,16 (0,06-0,39)	

El desarrollo de EICRa III-IV supuso un factor de riesgo de SLE (HR 5,41, p=1,48<sup>-9</sup>) (Tabla 45).

**Tabla 45. Variables tiempo-dependientes con posible impacto en la SLE.**

SLE		
	Hazard Ratio	p value
EICR aguda I-IV	0,76 (0,43-1,34)	0,338
EICR agudo II-IV	1,15 (0,63-2,10)	0,647
ECIR agudo III-IV	5,41 (3,13-9,36)	1,48 <sup>-9</sup>
EICR crónica	1,28 (0,46-3,54)	0,634

Respecto al estudio multivariable, un *B-content score* del donante con valor de 1 fue protector del evento con respecto a aquellos con *B-content score* de 0 (HR 0,48, p=0,048). Por otro lado, *B-content score* del receptor  $\geq 2$  resultó comportarse como factor de riesgo para menor SLE (HR 3,53, p=0,005) (Tabla 46).

**Tabla 46. Análisis multivariable de SLE.**

SLE		
	Hazard Ratio	p value
<b>B-content score donante</b>		
0	1	
1	0,48 (0,23-0,99)	0,048
2+3+4	1,28 (0,59-2,77)	0,536
<b>B-content score receptor</b>		
0	1	
1	1,34 (0,69-2,59)	0,391
2+3+4	3,53 (1,45-8,60)	0,005

Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)

#### 4.5.5. SG

Respecto a la SG las variables asociadas al evento fueron las siguientes: estadio avanzado de la hemopatía de base (HR 3,94, p=0,001); situación pre-TPH de enfermedad activa (HR 2,16, p=0,026); grupo KIR-B donante *Better y Best* (HR 2,57, p=0,002), de modo detallado ser catalogado como *Better* (HR 2,50, p=0,010) y ser catalogado como *Best* (HR 2,66, p=0,009); telómero del donante BB (HR 5,21, p=0,003); *B-content score* del donante  $\geq 2$  (HR 2,30, p=0,024); pareja D-R ambos con genotipo *KIR* AB/AB (HR 4,45, p=0,041); genotipo *KIR* del receptor Bx, es decir, AB o BB (HR 3,18, p=0,015); *B-content score* del receptor de 1 (HR 2,91, p=0,029) y  $\geq 2$  (HR 3,87, p=0,010); fallo de injerto primario mieloide (HR 3,66, p=0,007) (Tabla 47).

**Tabla 47. Análisis univariable de SG.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	SG (29 meses)		
	Absoluto (%)	Hazard Ratio	p value
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>			
Estadio precoz	44 (38,9)	1	
Estadio intermedio	54 (47,8)	1,60 (0,79-3,24)	p=0,189
Estadio avanzado	15 (13,3)	3,94 (1,72-9,03)	p=0,001

Variables	SG (29 meses)		
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>			
Remisión completa	51 (45,1)	1	
Remisión parcial	35 (31,0)	0,96 (0,45-2,03)	p=0,912
Enfermedad activa	27 (23,9)	2,16 (1,09-4,26)	p=0,026
<b>CMV estado serológico D/R</b>			
D-/R+	24 (21,2)	1	
Resto (+/+; +/-; -/-)	89 (78,8)	0,57 (0,29-1,10)	p=0,095
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>			
No	73 (64,6)	1	
Sí	40 (35,4)	0,55 (0,28-1,08)	p=0,081
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>			
No ( <i>Neutral</i> )	70 (61,9)	1	
Sí ( <i>Better+ Best</i> )	43 (38,1)	2,57 (1,42-4,65)	p=0,002
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>			
<i>Neutral</i>	70 (61,9)	1	
<i>Better</i>	24 (21,2)	2,50 (1,25-5,02)	p=0,010
<i>Best</i>	19 (16,8)	2,66 (1,28-5,56)	p=0,009
<b>Centrómero donante</b>			
AA	52 (46,0)	1	
AB	42 (37,2)	0,86 (0,44-1,71)	p=0,676
BB	19 (16,8)	1,91 (0,91-4,01)	p=0,086
<b>Telómero donante</b>			
AA	67 (59,3)	1	
AB	41 (36,3)	1,61 (0,86-2,99)	p=0,133
BB	5 (4,4)	5,21 (1,76-15,36)	p=0,003
<b>B-content score donante</b>			
0	32 (28,3)	1	
1	38 (33,6)	0,80 (0,34-1,88)	p=0,609
2+3+4	43 (38,1)	2,30 (1,12-4,72)	p=0,024
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>			
Donante AA/ Receptor AA	13 (11,6)	1	
Donante AB/ Receptor AA	14 (12,5)	1,77 (0,29-10,60)	p=0,533
Donante AB/ Receptor AB	66 (58,9)	4,45 (1,06-18,71)	p=0,041
Donante AA/ Receptor AB	19 (17,0)	4,08 (0,88-18,97)	p=0,073
<b>Genotipo KIR receptor</b>			
AA	27 (23,9)	1	
Bx(AB+BB)	86 (76,1)	3,18 (1,25-8,09)	p=0,015
<b>B-content score receptor</b>			
0	27 (23,9)	1	
1	55 (48,7)	2,91 (1,12-7,61)	p=0,029
2+3+4	31 (27,4)	3,87 (1,38-10,87)	p=0,010
<b>Fallo de injerto primario</b>			
No	108 (95,6)	1	
Sí	5 (4,4)	3,66 (1,43-9,33)	p=0,007

Variables	SG (29 meses)		
<b>EICR aguda grado III-IV</b>			
No	99 (87,6)	1	
Sí	14 (12,4)	5,06 (2,59-9,87)	p<0,001
<b>EICR crónica</b>			
No	90 (79,6)	1	
Sí	23 (20,4)	0,13 (0,03-0,55)	p=0,005

Respecto a la SG, la EICRa III-IV mostró ser factor de riesgo estadísticamente significativo (HR 7,29, p=4,05<sup>-11</sup>) (Tabla 48).

**Tabla 48. Impacto de variables tiempo-dependientes en la SG.**

	SG	
	Hazard Ratio	p value
<b>EICR aguda I-IV</b>	0,87 (0,47-1,61)	0,651
<b>EICR agudo II-IV</b>	1,53 (0,81-2,86)	0,187
<b>ECIR agudo III-IV</b>	7,29 (4,04-13,14)	4,05 <sup>-11</sup>
<b>EICR crónica</b>	0,40 (0,10-1,53)	0,179

En el análisis multivariable solo B-content score del receptor  $\geq 2$  y la presencia del gen 2DS2 en el donante resultaron asociarse a una menor SG (HR 3,12, p= 0,002 y HR 3,81, p=0,035), respectivamente (Tabla 49).

**Tabla 49. Variables con posible impacto en la SG. Análisis multivariable.**

SG	Hazard Ratio	p value
<b>B-content score receptor</b>		
0	1	
1	0,94 (0,52-1,71)	0,845
2+3+4	3,12 (1,51-6,45)	0,002
<b>Centrómero donante</b>		
AA	1	
AB	0,30 (0,09-1,03)	0,056
BB	0,31 (0,07-1,36)	0,120
<b>Gen 2DS2 en donante</b>		
No	1	
Sí	3,81 (1,10-13,24)	0,035

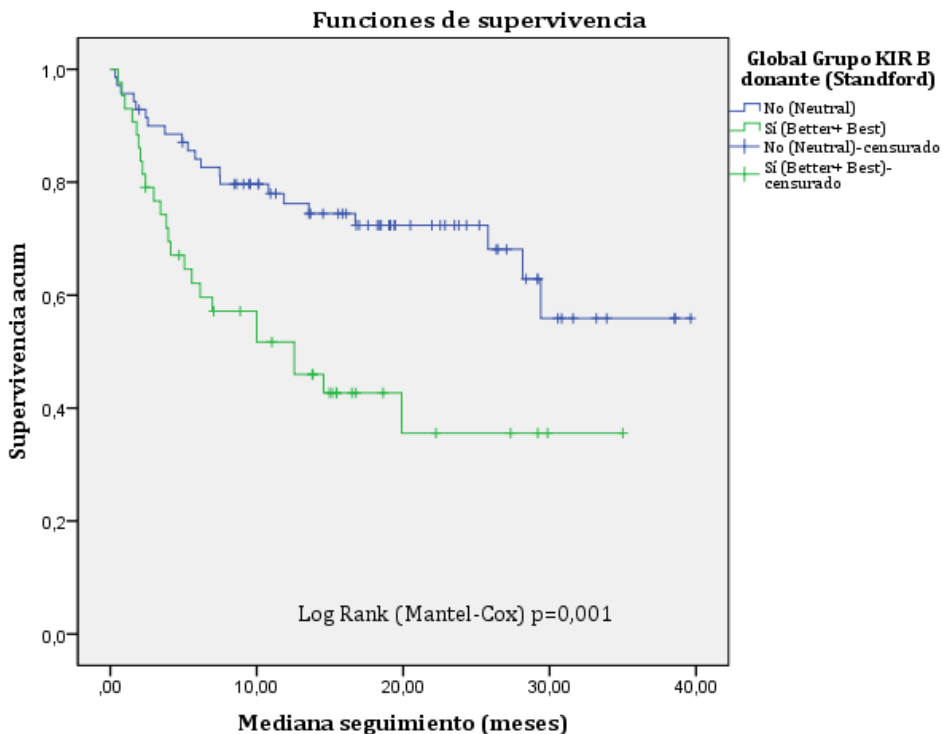
Selección de las variables mediante AIC (*Akaike's Information Criterion*)



Los resultados del análisis univariable que se exponen a continuación, sugirieron realizar un subanálisis incluyendo solo a los pacientes con diagnóstico de LMA (Tabla 50 y figuras 34-35).

**Tabla 50. Resultados, del análisis univariable con la totalidad de pacientes, que motivan subestudio en pacientes con LMA.**

ANÁLISIS GLOBAL	MNRR	SLE
N=113 parejas D/R	IA %(I.C 95%)	Hazard Ratio
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>		
No ( <i>Neutral</i> )	23,03 (12,11-36,01)	1
Sí ( <i>Better+ Best</i> )	50,47 (29,72-68,02) p=0,004	1,91 (1,10-3,31) p=0,021



**Figura 34. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del grupo KIR-B donante *Neutral* vs. *Better+Best*.**

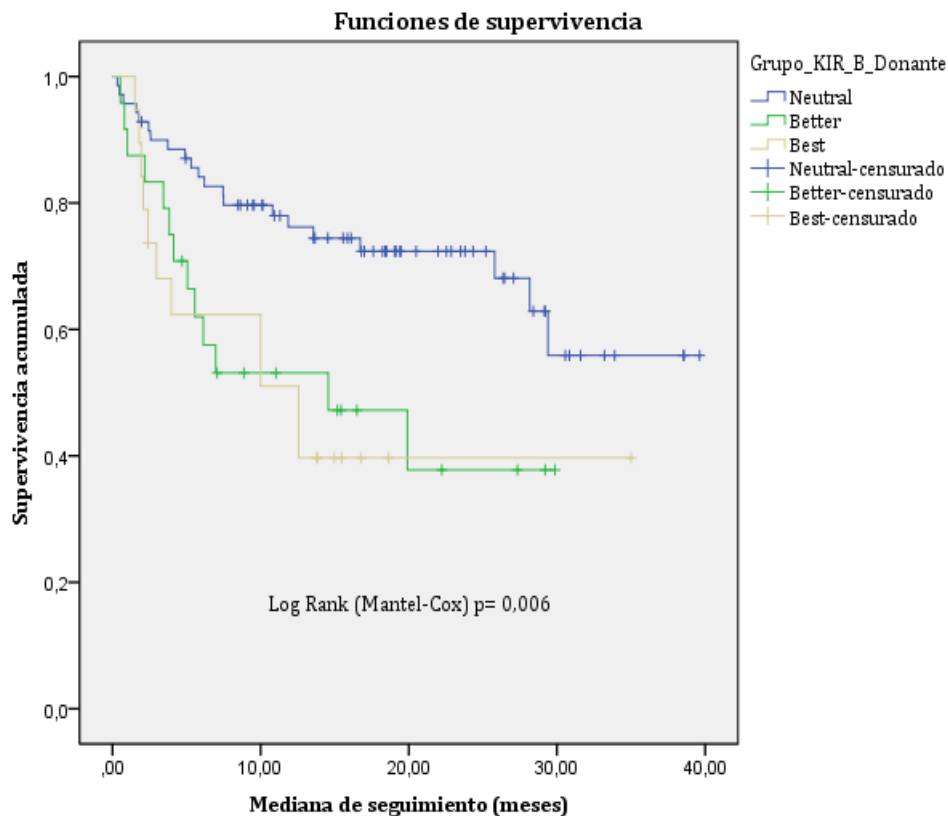


Figura 35. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del grupo KIR-B donante *Neutral vs. Better vs. Best*

#### 4.6. ANÁLISIS DEL GRUPO DE PACIENTES CON LMA

Pese al número limitado de pacientes con diagnóstico de LMA incluido en este estudio (N=35), la intención de este subanálisis fue conocer si se reproducían los resultados obtenidos en la serie global.

##### 4.6.1. MNRR EN LMA

En este subestudio, la MNRR en los pacientes con LMA que pre-TPH se encontraron en situación de RP fue mayor en comparación con los que estaban en RC (HR 2,38, p = 0,049), también lo fue el telómero donante BB (HR 8,12,

p<0,001) pero esta última situación solo contó con un paciente en la categoría. Por el contrario, el genotipo *KIR* en receptor de tipo Bx se asoció a una menor IA de MNRR (HR 0,41, p=0,029) (Tabla 51).

**Tabla 51. Análisis univariable, MNRR en LMA.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	MNRR		
	Absoluto (%)	Hazard Ratio	p value
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>			
Estadio precoz	21 (60,0)	1	
Estadio intermedio	12 (34,3)	1,05 (0,46-2,40)	p = 0,910
Estadio avanzado	2 (5,7)	0,00 (0,00-0,00)	p <0,001
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>	22 (62,9)	-	
Remisión completa	11 (31,4)	2,38 (1,00-5,65)	p = 0,049
Remisión parcial	2 (5,7)	0,00 (0,00-0,00)	p <0,001
Enfermedad activa			
<b>Centrómero donante</b>			
AA	52 (46,0)	1	
AB	42 (37,2)	1,01 (0,55-1,88)	p=0,970
BB	19 (16,8)	1,76 (0,85-3,62)	p=0,127
<b>Telómero donante</b>			
AA	22 (62,9)	1	
AB	12 (34,3)	1,03 (0,42-2,50)	p=0,960
BB	1 (2,9)	8,12 (2,82-23,32)	p<0,001
<b>Gen <i>2DS2</i> en donante</b>			
No	18 (51,4)	1	
Sí	17 (48,6)	1,74 (0,76-3,98)	p=0,190
<b>Genotipo <i>KIR</i> receptor</b>			
AA	10 (28,6)	1	
Bx(AB+BB)	25 (71,4)	0,41 (0,19-0,91)	p=0,029
<b><i>B</i>-content score receptor</b>			
0	10 (28,6)	1	
1	15 (42,9)	0,46 (0,19-1,09)	p=0,076
2+3+4	10 (28,6)	0,34 (0,10-1,15)	p=0,083
<b>Compatibilidad genotipo <i>KIR</i> donante/receptor</b>			
Donante AA/ Receptor AA	6 (17,6)	1	
Donante AB/ Receptor AA	4 (11,8)	1,28 (0,51-3,20)	p=0,600
Donante AB/ Receptor AB	18 (52,9)	0,54 (0,20-1,47)	p=0,220
Donante AA/ Receptor AB	6 (17,6)	0,12 (0,01-1,16)	p=0,068

#### 4.6.2. SLE EN LMA

El grupo KIR-B del donante categorizado como “Best” según el modelo de Standford se asoció a peor SLE (HR 4,08, p=0,045) (Tabla 52).

**Tabla 52. Análisis univariable, SLE en LMA.** (Variables más destacadas, el resto de variables disponibles en el anexo XI).

Variables	SLE		
	Absoluto (%)	Hazard Ratio	p value
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>		1	
Remisión completa	22 (62,9)	2,27 (0,91-5,65)	p = 0,079
Remisión parcial	11 (31,4)	0,00 (0,00-Inf)	p=0,998
Enfermedad activa	2 (5,7)		
<b>Remisión completa</b>			
Sí	22 (62,9)	1	
No	13 (37,1)	2,24 (0,90-5,59)	p = 0,083
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>			
0 o 1	6 (17,1)	1	
2 o 3	29 (82,9)	0,25 (0,05-1,32)	p = 0,104
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>			
No (Neutral)	24 (68,6)	1	
Sí ( <i>Better+ Best</i> )	11 (31,4)	2,59 (0,99-6,81)	p = 0,053
<b>Centrómero donante</b>			
AA	52 (46,0)	1	
AB	42 (37,2)	0,71 (0,26-1,99)	p = 0,517
BB	19 (16,8)	3,07 (0,77-12,34)	p = 0,114
<b>Telómero donante</b>			
AA	22 (62,9)	1	
AB	12 (34,3)	1,46 (0,55-3,87)	p = 0,442
BB	1 (2,9)	7,81 (0,83-73,21)	p = 0,072
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>			
Neutral	24 (68,6)	1	
Better	6 (17,1)	2,08 (0,65-6,59)	p = 0,216
Best	5 (14,3)	4,08 (1,03-16,16)	p = 0,045

## **Discusión**



## 5. DISCUSIÓN

Con el haplo-TPH se abre la posibilidad de que más del 95% de los pacientes que precisan un alo-TPH puedan encontrar, al menos, un donante entre sus familiares (34,57,96). Esta probabilidad es muy superior a la de disponer de un DE HLA-idéntico que se estima en un 25%. Respecto a la probabilidad de encontrar, antes de dos meses, un DNE HLA-idéntico o compatible, actualmente es del 93% (31); pero si se considera la urgencia clínica del TPH esta probabilidad desciende al 60-70% (33). Sin embargo, cuando el paciente dispone de más de un donante haploidéntico, seleccionar el mejor donante continúa siendo un reto ya que coexisten factores clínicos D/R, factores relacionados con la hemopatía de base, factores inmunológicos como la compatibilidad HLA, la presencia de ADE y la alorreactividad NK, así como factores relacionados con la fuente de PH empleada y el régimen de acondicionamiento. Uno de los aspectos más relevantes de cara al éxito de los haplo-TPH es la selección del mejor donante disponible. Sin embargo, existe cierta controversia sobre cómo llevar a cabo dicha selección. Múltiples grupos han sugerido criterios de selección basados en edad, sexo, etc. (95,96,153-156).

El presente estudio pretende aportar información que ayude a mejorar los criterios de selección del mejor donante haploidéntico. Esta investigación sugiere que tras descartar ADE, debe ser priorizado el donante de menor edad (menor de 40 años), CMV seropositivo y la compatibilidad HLA en dirección  $GvH \geq 6/10$ . Además, respecto a la alorreactividad NK, el modelo de Standford junto con *B-content score* (tanto del donante como del receptor), y la información contenida en ellos, son los que han presentado relevancia clínica en esta cohorte de pacientes.

De acuerdo con lo publicado por investigadores del hospital Johns Hopkins (Baltimore, USA), en el 98,2% de nuestra cohorte se identificó un familiar de primer grado HLA-haploidéntico y la media de donantes disponibles por paciente fue de 2,5 (96). El grado de parentesco más frecuente fue el de hijo/a (61,1%), probablemente debido a la edad media del receptor (54 años).

La cohorte de pacientes estudiada se considera de alto riesgo por el estado de la enfermedad (54,9% estaba en situación distinta a RC en el momento del TPH) y por haber recibido un TPH previo en el 34,5% de los casos.

Que la mayoría de los donantes utilizados en nuestra serie fueran jóvenes de menos de 40 años se justifica por las recomendaciones de estudios y sociedades científicas como REDMO que, en enero de 2018, lo estableció como edad máxima para la inscripción de sus nuevos donantes (157). En el estudio de Wang *et al.*, 2014, que analizaba 1210 haplo-TPH de DE, se observó que una edad del donante inferior a 30 años se correlacionaba con una menor incidencia de EICRa superior o igual a grado II, así como con una mejora de la SG (155). Wu *et al.*, 2021, estudiaron 512 haplo-TPH no manipulados basados en protocolo con ATG y obtuvieron también mejores resultados del haplo-TPH con donante joven (<35 años). Observaron, asimismo, que el aumento de la edad del donante ( $\geq 35$  años) empeoraba la SG (HR 1,08;  $p=0,044$ ) y aumentaba el riesgo de EICRa III-IV (HR 1,17;  $p=0,005$ ) (158). Canaani *et al.*, 2018, al analizar retrospectivamente 1270 pacientes con LA sometidos a haplo-TPH, encuentran beneficio al utilizar un donante joven (<40 años) siempre y cuando el receptor sea mayor de 40 años. En estos receptores mayores de 40 años, tener un donante  $\geq 40$  años implicó incremento de la MNRR (HR 1,86;  $p=0,007$ ), peor SLE (HR 1,59;  $p=0,007$ ) y peor SG (HR 1,74;  $p=0,002$ ). No obstante, en los receptores con edad inferior a 40 años, la edad del donante no tuvo impacto (159). DeZern *et al.*, 2021 analizaron 889 pacientes adultos sometidos a haplo-



TPH de MO con AIR y CFM-post. La media de edad de los receptores fue de 59 años (18-76) y de los donantes, de 40 años (13-79). Los donantes se categorizaron en tres grupos de edad (<30, 30-44 y ≥45 años). El análisis multivariable demostró que el aumento de la edad del donante por década se asoció con peor SG (HR 1,13; p=0,0015), peor SLE (HR 1,09; p= 0,015) y riesgo de EICRa III-IV (HR 1,30; p=0,013). Estos peores resultados con donantes mayores de 45 años se atribuyeron a mayor MNRR (HR 1,19; p= 0,006). En nuestro estudio, el **donante menor de 40 años**, en el análisis uni y multivariable, **se asoció con reducción de la incidencia de EICRa grado II-IV** (HR 0,46; p=0,016), lo cual apoya que en el algoritmo de selección del mejor donante, la edad sea un criterio relevante a tener en cuenta.

Otro factor relacionado con las características del donante es el estado serológico frente a CMV y su identidad con el del receptor. En este estudio, **cualquier condición distinta de donante CMV- y receptor CMV+** (CMV D-/R+), en el estudio multivariable **protegió frente al desarrollo de EICRa grado II-IV** (HR 0,44; p=0,023). Está bien establecido que la combinación CMV D-/R+ presenta un mayor riesgo de infección por CMV (160–163). Algunos estudios previos muestran una asociación entre la infección por CMV y el mayor riesgo de EICRa. El estudio de Mariotti *et al.*, 2019, tras analizar 513 haplo-TPH asociados a CFM-post, demostró que la IA de EICRa II-IV era más frecuente tras la infección por CMV (HR 2,06; p=0,001). En su estudio, los que más reactivaron esta infección fueron las parejas D-/R+ para CMV (164). Esto sugiere una posible asociación entre el estado serológico D/R frente al CMV y el desarrollo de EICRa. El estudio de Akahoshi *et al.*, 2021, con 6078 alo-TPH incluidos, observó que la infección por CMV se asociaba con un incremento de la EICRa II-IV (HR, 1,34; p=0,014). Sin embargo, en dicho estudio, la interacción entre EICRa II-IV y reactivación de CMV no resultó significativa (p=0,326) (165). En el análisis actual, el estado serológico del donante no muestra impacto en la

MNRR o la SG. Esto mismo ocurre en el estudio de Cesaro *et al.*, 2018, al analizar el efecto que tiene el estado serológico del donante frente al CMV en los eventos clínicos de 983 pacientes tratados con haplo-TPH no manipulados, todos ellos seropositivos para CMV. La MNRR a un año fue del 21,3% en las parejas D+/R+ CMV y 18,8% en aquellas D-/R+ CMV ( $p=0,40$ ). Asimismo, la SG a un año fue del 55,1% y 55,7% en los mismos grupos ( $p=0,50$ ) (166). Del mismo modo, dos estudios retrospectivos muestran que la serología CMV del donante tampoco supuso un impacto clínico en la SG o la MNRR de pacientes tratados con haplo-TPH con CFM-post (167,168). Sin embargo, Solomon *et al.*, 2018, observaron que la combinación de D-/R+ CMV se asoció con peor SG (HR 2,54;  $p < 0,001$ ) y SLE (HR 2,48;  $p < 0,001$ ) debido a incremento de la MNRR (HR 3,04;  $p=0,018$ ) (153).

Otra de las características clínicas a analizadas en nuestro estudio es el impacto del sexo del donante, mostrando en el análisis univariable que cuando se utiliza una **donante mujer, aumenta la incidencia de recaída** (IA 34,05% vs. 15,56%;  $p=0,041$ ). A su vez, en el análisis multivariable se observa tendencia a que el donante varón pudiera ser factor protector frente a la recaída (HR 0,43;  $p=0,080$ ). Además, el estudio de Wang *et al.*, 2014, demuestra una menor MNRR cuando se utiliza un donante varón (HR 0,65;  $p=0,002$ ) implicando mejoría en la SG (HR 0,73;  $p=0,005$ ) (155). Por otro lado, las mujeres que han sido gestantes tienen mayor riesgo de estar aloinmunizadas frente a diferentes sistemas antigénicos (169). El cromosoma Y es uno de los antígenos menores de histocompatibilidad cuya presencia en las células leucémicas, puede provocar una respuesta injerto contra leucemia. Por eso, en los receptores varones cuyo donante es mujer la recaída puede ser menor (170,171). Asimismo, la literatura muestra que cuando un paciente varón tiene como donante una mujer aumenta el riesgo de EICR y MNRR probablemente debido a la existencia de antígenos menores de histocompatibilidad en el cromosoma Y frente a los que la mujer

puede estar inmunizada (171,172). Por todo ello, se considera que el donante más favorable es el varón.

**En cuanto a la relación de parentesco entre donante y receptor, en nuestro estudio no se encontraron diferencias con significación clínica respecto al desarrollo de EICRa, EICRc, recaída, MNRR, SLE ni SG.** Igualmente, McCurdy *et al.*, 2018, observaron que la incidencia de recaída (HR, 1,14;  $p=0,45$ ) y MNRR (HR 0,78;  $p=0,25$ ) no varía significativamente si el donante es hermano/a o hijo/a (167). Estos datos difieren de lo observado por Wu *et al.*, 2021, ya que cuando el donante es hermano/a y el paciente tiene menos de 35 años es menor la MNRR, mejorando la SLE y la SG si se compara con un donante progenitor (158). Hay que considerar que el estudio de Wu *et al.* difiere del nuestro por tratarse de haplo-TPH sin depleción T utilizando ATG, en lugar de CFM-post, y también en los grados de parentesco analizados, ya que consideran únicamente hermanos e hijos y, en nuestro caso, además se incluyen como donantes padres, madres y familiares de segundo grado (sobrinos). En este sentido parece que la idoneidad del donante puede estar más condicionada por la edad que por el grado de parentesco.

**La compatibilidad ABO entre D/R no mostró ningún efecto en los eventos de interés analizados en nuestra serie, probablemente debido al número limitado de pacientes y a la alta frecuencia de compatibilidad ABO entre D/R** en nuestro estudio (85%). El análisis de la literatura muestra que aunque la incompatibilidad ABO no supone un impedimento para la realización de un alo-TPH, dicha incompatibilidad se asocia a un aumento de la morbilidad por retrasar el injerto hematopoyético o incrementar las necesidades transfusionales (98,173). Sin embargo, su impacto pronóstico en el TPH alogénico es controvertido, ya que los datos reportados en la literatura son con frecuencia contradictorios (174). Aun así, Logan *et al.*, 2015, observaron que la

incompatibilidad menor ABO en 1737 alo-TPH, comparándola con parejas D/R ABO compatibles, se asocia con aumento de la MNRR (HR 1,48 ; p=0,02) y tiene efecto negativo en la SG (HR 1,56 ; p=0,001) en aquellos pacientes cuya fuente de PH fue la MO, sin que se reproduzca el efecto cuando se analizó la SP como fuente de PH (99). En nuestra serie, la fuente de PH empleada mayoritariamente fue la SP. Del mismo modo, Canaani *et al.*, 2017, en pacientes con diagnóstico LMA tratados con haplo-TPH, si la incompatibilidad ABO es bidireccional, aumenta el riesgo de ECIRa grado II-IV (HR 2,39; p=0,01). Además, en caso de injerto de MO asociado a incompatibilidad ABO mayor empeoró la supervivencia (HR 1,82; p=0,033), concluyendo que ante incompatibilidad ABO, tanto mayor como menor, los pacientes deberían recibir SP como fuente de PH (175). Asimismo, está publicado por Scholl *et al.*, 2005, que la incompatibilidad ABO mayor puede conllevar anemia hemolítica, retraso del injerto de la serie roja así como aplasia pura de la serie roja (176). Por tanto, si la fuente de PH es SP parece que la compatibilidad ABO no tiene impacto y sería la fuente idónea ante incompatibilidad ABO mayor o menor.

En nuestra cohorte observamos una mayor representación de pacientes con **enfermedades mieloides malignas** (LA+patología mieloide). Estas **supusieron una menor incidencia de recaída** en comparación al resto de diagnósticos, en el análisis univariable, (IA 27,26% vs. 6,01%; p=0,045) lo que sugiere un mayor efecto injerto contra receptor en este tipo de neoplasias, al menos en la plataforma de haplo-TPH utilizada en nuestra serie. De hecho, Cooley *et al.* 2010, postulan que determinados genes *KIR* puedan reconocer distintos tipos de ligandos presentes en células leucémicas mieloides pero no linfoides (49).

**La enfermedad de base en estadio avanzado se comportó como un factor de riesgo tanto de recaída (HR 6,80; p=0,007) como de MNRR (HR**

16,34;  $p=0,001$ ) en el análisis multivariable. **A su vez**, en el univariable **implicó peor SLE** (HR 3,91;  $p<0,001$ ) y una **menor SG** (HR 3,94;  $p=0,001$ ). Publicaciones previas han mostrado resultados similares. Santoro *et al.*, 2019, estudiaron retrospectivamente 912 pacientes mayores de 45 años con LMA sometidos a haplo-TPH no manipulado, observando que el estadio avanzado de la enfermedad de base en el momento del TPH fue el principal factor asociado a peor SLE (HR 1,88;  $p<0,05$ ) y peor SG (HR 1,81;  $p<0,05$ ) (177). Armand *et al.*, 2012, concluyen que la probabilidad de mortalidad en pacientes con estadio de la enfermedad con riesgo bajo e intermedio es menor (HR 0,6;  $p<0,0001$ ) que en aquellos con alto riesgo (HR 1,8;  $p<0,0001$ ) o muy alto riesgo (HR 3,1;  $p<0,0001$ ). Estos grupos también se diferenciaron en términos de SLE a los cuatro años, con un 56% en los pacientes del grupo de bajo riesgo frente al 6% en el grupo de muy alto riesgo ( $p<0,0001$ ). La mejora de la supervivencia fue a expensas de una menor incidencia de recaída en el grupo de bajo riesgo (HR 0,4;  $p<0,0001$ ), aumentando esta conforme se incrementa el riesgo de la hemopatía de base en enfermedad de alto riesgo (HR 2;  $p<0,0001$ ) y en la de muy alto riesgo (HR 2,5;  $p=0,0002$ ). No obstante, en el estudio de Armand *et al.* 2012 no hubo impacto en la MNRR (100). Posteriormente, el mismo autor en 2014 obtiene el mismo resultado, esta vez comparando la SG de pacientes con enfermedad de bajo riesgo frente a aquellos con riesgo intermedio (HR 1,46;  $p<0,0001$ ), riesgo alto (HR 2,30;  $p<0,0001$ ) y riesgo muy alto (HR 2,97;  $p<0,0001$ )(101). Por tanto, nuestros resultados confirman que el estado de la enfermedad pre-TPH influye de forma significativa en la evolución del trasplante. Por otro lado, los estudios llevados a cabo por Armand *et al.*, 2012, clasificando los pacientes en grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto y muy alto) según el estadio de la enfermedad de base, revelaron que la mortalidad incrementa en función del grupo de riesgo del paciente, con valores de HR de 0,6; 1,8 y 3,1 para los grupos de riesgo bajo, alto y muy alto, respectivamente  $p<0,0001$  (100).

Por otra parte, **la situación de RC previa al haplo-TPH se asoció a una menor MNRR** en el análisis multivariable (HR 0,20; p=0,035) **y una menor incidencia de EICRa grado III-IV** (3,92% vs. 17,88%; p=0,022) en el univariable. **Por el contrario, la presencia de enfermedad activa se asoció a menor SLE** (HR 2,16; p=0,015) **y SG** (HR 2,16; p=0,015) en el análisis univariable. En línea con nuestros resultados, Rubio *et al.*, 2016, estudiaron 696 haplo-TPH no manipulados (425 con acondicionamiento MA y 271 con AIR), donde observaron que tener enfermedad activa aumentó tanto el riesgo de recaída (HR 4,43; p<0,001) como el de MNRR (HR 1,86; p=0,0002). Este hecho justificó una peor SLE (HR 2,94; p<0,001) y SG (HR 2,92; p<0,001) (178). Asimismo, Srouf *et al.*, 2019, compararon pacientes en RC en el momento del trasplante frente a los que tenían enfermedad activa en 143 haplo-TPH, mostrando una peor SLE (HR 3,5; p<0,001) y SG (HR 3,7; p<0,001) (179). Del mismo modo, Norsworthy *et al.*, 2022, analizaron 4482 alo-TPH en pacientes con LMA, observando que aquellos en RC estricta pre-TPH tenían mejor SG en comparación con aquellos en RC incompleta (con recuperación hematológica o plaquetaria incompleta (HR 0,73) o los refractarios (HR 0,33) (180).

En cuanto al impacto de la fuente de PH, en nuestra serie la SP fue la fuente de PH utilizada mayoritariamente (87,6%). Sanz *et al.*, 2020, reportaron que el uso de SP en haplo-TPH se asocia con aumento del riesgo de desarrollar EICR tanto aguda como crónica, con disminución del riesgo de recaída, en comparación con MO. Concretamente, incrementó el riesgo de EICRa II-IV (HR 1,93; p<0,001), EICRa III-IV (HR 1,86; p=0,02), EICRc (HR 1,71; p=0,001) y asoció menor recaída con esta fuente de PH (HR 0,74; p=0,04) (181). De forma similar, en el análisis univariable del presente estudio, la IA de EICRa II-IV fue del 39,64% con fuente de PH de SP frente al 7,14% al emplear MO (p=0,023), y el análisis multivariable mostró que **el uso de MO como fuente de PH protege frente al desarrollo de EICRa II-IV** (HR 0,13; p=0,044). Por otro lado, Canaani

*et al.*, 2017, observan en su estudio que los pacientes trasplantados con injertos de MO y que además tuvieran incompatibilidad ABO menor presentaron aumento de la incidencia de EICRa II-IV (HR 2,03;  $p=0,04$ ). Al igual que ocurre en otras modalidades de alo-TPH, la base patogénica se fundamenta en el número absoluto significativamente mayor de células T en el inóculo de SP respecto al de MO (182,183).

Respecto al régimen de acondicionamiento, en nuestro estudio la mayor parte de los pacientes recibieron un acondicionamiento AIR (70,8%). El estudio univariable muestra que el **régimen MA se asoció con una menor incidencia de EICRa grado II-IV** frente al AIR (IA 19,78% vs. 41,77%;  $p=0,049$ ), sin efecto significativo sobre el resto de eventos considerados. Este hallazgo es acorde con lo publicado por Rubio *et al.*, 2016 o Santoro *et al.*, 2019 (177,178) que no detectan diferencias significativas en los resultados de supervivencia en el haplo-TPH no manipulado en función del tipo de acondicionamiento. Rubio *et al.*, 2016 ni siquiera encuentran diferencias entre ambos acondicionamientos (AIR y MA) y la incidencia de EICRa II-IV (24 vs. 29 %,  $p=0,23$ ) (178). La falta de impacto en la incidencia de recaída puede deberse al número limitado de pacientes analizados o que el efecto injerto contra receptor asociado a un alto grado de incompatibilidad HLA anula el efecto del tratamiento de acondicionamiento MA.

La compatibilidad HLA D/R es otro de los factores fundamentales evolución del TPH (184–188). Respecto a la selección del donante en relación con el sistema HLA, en nuestro estudio, el análisis univariable muestra que **a mayor disparidad HLA en sentido GvH, menor MNRR**. Es decir, las parejas D/R “*half-matched*” comparado con aquellas con compatibilidad HLA extra  $\geq 6/10$  en sentido GvH, mostraron una menor MNRR (IA 22,16% vs. 44,59%;  $p=0,017$ ). Estos resultados apoyarían el algoritmo clásico de selección de

donante haploidéntico publicado por Ciurea y Champlin en 2013 (95), según el cual el primer criterio de elección tras el descarte del donante con ADE frente al paciente era la priorización del “*full haplotype mismatch donor*” sobre el donante con mayor compatibilidad HLA. También estarían en línea con los publicados por Kasamon *et al*, 2010, que indican que la disparidad HLA tiene un efecto protector en la evolución del haplo-TPH, aunque estos investigadores valoran la SLE total (48). Este efecto positivo de la disparidad HLA en dirección *GvH* en la evolución del trasplante podría explicarse si dicha incompatibilidad conllevara diferencias en los *loci* HLA-A, B o C que activasen la alorreactividad con efecto antitumoral mediada por las células NK. Por otra parte, en la revisión que Bacigalupo y Laurenti realizan en 2018 para identificar al mejor donante haploidéntico destacan que en el haplo-TPH no manipulado el número de incompatibilidades HLA (bajo de 0-2 vs. alto de 3-4) no influye en el resultado. Aunque la incompatibilidad antigénica en el *locus HLA-DRB1* es factor de riesgo de EICRa grado II-IV en protocolos asociados a CFM-post (HR 2,0; p=0,02) (189,190). En nuestro estudio no se ha podido valorar el efecto de las disparidades de *loci* individuales debido al bajo número muestral, ya que la complejidad del análisis cuando hay múltiples incompatibilidades, que implica estratificar el *locus* que se está valorando en función de las disparidades en el resto de los otros *loci*, requiere un número de muestras considerablemente elevado.

Por otro lado, nuestros resultados contrastan con resultados aportados en publicaciones previas, Raiola *et al*, 2018; Huo *et al*, 2018; Wang *et al*, 2014 o Kasamon *et al*, 2010, en las que la disparidad HLA no implicó un peor resultado del haplo-TPH (48,155,191,192). A diferencia de lo observado en nuestro estudio, Solomon *et al*, 2018, al estudiar 208 haplo-TPH, establecen que el incremento en el número de disparidades HLA en sentido *GvH* (4-5 incompatibilidades frente al grupo con 1, 2 o 3) se asocia con aumento de la



MNRR (HR 4,99;  $p=0,043$ ) y protección frente a la recaída (HR 0,29;  $p=0,001$ ) por tanto concluyen que la disparidad HLA en dirección *GvH* no produce ningún efecto neto sobre la evolución final del trasplante (153).

En el estudio multivariable de nuestra serie, **la compatibilidad HLA dirección *GvH*  $\geq 6/10$  protegió de la recaída** (HR 0,23;  $p=0,012$ ). Este resultado nos permite concluir que el efecto de la disparidad HLA en la evolución del trasplante es vectorial, ya que la compatibilidad HLA en dirección *HvG*, que podría ir asociada a una mayor incidencia de pérdida de injerto, no tiene ninguna influencia en la evolución del trasplante en nuestro estudio. La gran controversia existente sobre el efecto de la disparidad HLA en el haplo-TPH puede deberse a factores asociados al trasplante que incidan directamente en la población de células T alorreactivas responsables de las reacciones alógenicas mediadas por la compatibilidad HLA, como el tipo inóculo de la infusión (completo o deplecionado de células T), la profilaxis post-TPH, que modula las células T alorreactivas del donante, y la fuente de PH (con mayor o menor número de células T para el TPH).

En el presente estudio, hemos caracterizado completamente el perfil inmunogenético *HLA* y *KIR* de la población de pacientes hematológicos. La caracterización del perfil *HLA* se realizó siempre por alta resolución, definiendo el alelo, al menos, a nivel de segundo campo (es decir, definición de cuatro dígitos según la nomenclatura clásica anterior a la vigente) en los 5 *loci* principales (*A*, *B*, *C*, *DRB1* y *DQB1*). Respecto a la distribución de alelos en cada *locus*, observamos que **el *locus HLA-B* presenta la mayor diversidad de alelos encontrados en esta población y el *locus HLA-DQB1* la menor**, en comparación con los *loci HLA-A*, *-C* y *-DRB1*. Estos datos de diversidad coinciden con lo referido a población sana en el estudio de Montero-Martín *et al.*, 2019, donde se analizan 282 individuos sin relación de parentesco, que proceden de

distintas regiones de España (145) y con los de Guerreiro *et al.*, 2021 analizando 4513 pacientes españoles sometidos a alo-TPH (105). De forma similar, Balas *et al.*, 2011 analizan 253 pacientes españoles con hemopatías malignas, hallando que el *locus HLA-B* es el que presenta mayor grado de polimorfismo (193). Por otro lado, en nuestro estudio **se descarta la existencia de desviaciones respecto al equilibrio esperado de Hardy-Weinberg en los loci-HLA analizados.**

Además, ***HLA-C* y *-DQB1*** son los únicos *loci* que muestran desviación estadísticamente significativa de la neutralidad y, por lo tanto, una **selección equilibrada** más pronunciada **sin hallar ningún loci de los estudiados donde se produzca una selección direccional** ( $F_{nd} > 0$ ). No obstante, Guerreiro *et al.*, 2021 demuestran que los *loci HLA-A* y *-B* (además de *-DPB1*) ofrecen valores  $F_{nd}$  superiores a 0 siendo acorde con selección direccional o efectos demográficos extremos (105,145,194). Los resultados de frecuencias alélicas del sistema HLA en los pacientes fueron acordes a los hallados en la literatura que ofrece datos sobre pacientes hematológicos (105,193).

Los **alelos HLA más prevalentes en nuestro estudio con frecuencias superiores al 5% fueron:** 1) para el *locus HLA-A*: ***A\*02:01*, *A\*01:01*, *A\*03:01*, *A\*24:02*, *A\*11:01*, y *A\*29:02***. Exactamente los mismos que los encontrados en los estudios mencionados (105,193); 2) para el *locus HLA-C*: ***C\*07:01*, *C\*04:01*, *C\*05:01*, *C\*07:02*, *C\*16:01*, *C\*06:02*, *C\*12:03*, *C\*08:02* y *C\*02:02*** (salvo este último alelo, el resto coincidió con lo publicado por Guerreiro *et al.*, 2021 (105)); 3) para el *locus HLA-B*: ***B\*18:01*, *B\*51:01*, *B\*44:03***, que también coinciden con lo descrito previamente en población española (105,193). En los artículos citados además se encontraron como alelos prevalentes ***B\*07:02* y *B\*08:01*** (105); 4) respecto al *locus HLA-DRB1*: ***DRB1\*07:01*, *DRB1\*03:01*, *DRB1\*15:01*, *DRB1\*01:01* y *DRB1\*11:01***. En la

literatura también está publicado el alelo *DRB1\*13:01* con frecuencia superior al 5%. No obstante, en nuestro análisis además observamos **el alelo *DRB1\*01:02***, descrito en estudios previos con frecuencias próximas aunque no superiores al 5% (105,193). En el *locus HLA-DQB1*, acorde a lo descrito se obtuvieron los siguientes alelos: ***DQB1\*03:01***, ***DQB1\*05:01***, ***DQB1\*02:02***, ***DQB1\*02:01***, ***DQB1\*03:02*** y ***DQB1\*06:02***. La literatura identifica también con prevalencia superior al 5% *DQB1\*06:03* que en nuestro estudio obtuvo una frecuencia del 3,91%, acorde con la frecuencia de *DRB1\*13:01* encontrada en nuestro análisis, alelo en gran desequilibrio de ligamiento (105,193).

En estudios previos al analizar el grado de **asociación entre los loci con mayor desequilibrio de ligamiento**, los haplotipos de clase I más representados son: *HLA-B\*40:01~C\*03:04*; *B\*13:02~C\*06:02*; *B\*38:01~C\*12:03* y *B\*07:02~C\*07:02* (105). De las asociaciones enunciadas, solo se encontró en nuestro estudio con frecuencia superior al 5% y LD la asociación ***B\*07:02~C\*07:02*** y otra que también se objetivó, fue ***C\*08:02~B\*14:02***.

En lo que respecta a las asociaciones HLA de clase II los haplotipos más representados fueron los siguientes: ***DRB1\*07:01~DQB1\*02:02***; ***DRB1\*03:01~DQB1\*02:01***; ***DRB1\*15:01~DQB1\*06:02***, siendo *DRB1\*03:01 ~ DQB1\*02:01* la asociación más estable. Datos coincidentes con lo publicado por Guerreiro *et al.*, 2021 (105).

Todo lo anterior confirma que pese al tamaño de nuestra muestra, es representativa de la población española de pacientes hematológicos. La distribución de frecuencias encontrada tampoco se desvía significativamente de las referidas en la población sana (145,195).

En cuanto a la caracterización del perfil genético *KIR* de nuestra población de **pacientes, los genotipos *KIR* 1, 2 y 4 fueron los más prevalentes**, con valores de **frecuencias superiores a un 10%**. Estos datos son acordes en parte, a los reportados para la población caucásica española, que presenta los genotipos 1, 3, 4 y 2 como los más frecuentes (frecuencias de 16,9%, 16,9%, 15,15% y 12,7%, respectivamente) (108). **Sin embargo, el genotipo *KIR* identificado como 3**, que es el segundo en frecuencia según lo referenciado, en nuestro análisis obtuvo una **frecuencia del 3,5%** en pacientes. Esto podría explicarse tanto por el limitado tamaño de la muestra, que pueda dificultar la reproductibilidad de las frecuencias del genotipado *KIR* en comparación con la población general, o también que el genotipo 3 pudiera ser protector frente a enfermedades hematológicas. Esto por supuesto, es una posible hipótesis que requiere mayor investigación. No obstante, a nuestro conocimiento este es uno de los primeros estudios en los que se analiza la distribución de frecuencias de los genotipos *KIR* en pacientes con hemopatía maligna.

Al comenzar a plantear esta investigación, a finales del 2014, el algoritmo de selección de donante más utilizado era el propuesto por Ciurea y Champlin, 2013 (95), en el que algunos criterios tenían una evidencia biológica y clínica limitada, como era la valoración de la alorreactividad NK del donante. De nuestra cohorte de pacientes únicamente el 41,6% cumplía con parte de los criterios de selección del algoritmo de Ciurea y Champlin. Es decir, solo 47 pacientes dispusieron de donante que reunía simultáneamente estos criterios: joven, varón, isogrupo ABO y sin ADE en el receptor. La ausencia de ADE fue criterio de inclusión del donante, por tanto ese criterio lo cumplió el 100% de la cohorte. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los resultados globales de aquellos que, además de la ausencia de ADE, cumplieron

dos o tres de estos criterios cuando lo comparamos con el grupo que no cumplió ninguno o solo uno.

Otro de los aspectos que tiene en consideración algoritmos como el inicial de Ciurea y Champlin, 2013 (95) para mejorar la selección del donante es la alorreactividad NK, si bien en dicho algoritmo este criterio es el último a tener en cuenta para la priorización del donante. En cuanto al análisis del impacto de la alorreactividad NK en nuestro estudio, evaluada según los distintos modelos propuestos, la incompatibilidad ligando-ligando y el grupo KIR-B del donante (Standford) fueron los que permitieron segregar la cohorte de estudio en grupos numéricamente más homogéneos, y por tanto ofrecer mayor discriminación en cuanto a la predicción de alorreactividad. Con el **modelo de incompatibilidad ligando-ligando** solo el **35,4%** de **parejas D/R** se consideraron **potencialmente alorreactivas**, y el **38,1%** **según modelo del haplotipo KIR del donante**, mientras que con el resto de modelos más de la mitad de las parejas D/R eran potencialmente alorreactivas: el **83,2%** **según** el modelo de **incompatibilidad receptor-ligando**; el **65,5%** **según** el modelo de **ausencia de ligando KIR en receptor** y el **62,8%** **según** el modelo de **incompatibilidad KIR-KIR**. Nuestros resultados no se pueden comparar extensamente con la bibliografía ya que es de los pocos estudios en los que se analiza simultáneamente el impacto de los distintos modelos de predicción de alorreactividad NK, siendo esta una de las mayores fortalezas de este trabajo. De la bibliografía revisada, destaca el estudio de Solomon *et al.*, 2018, que compara simultáneamente varios modelos de predicción de alorreactividad (ligando-ligando; receptor-ligando; haplotipo KIR; *B-content* score y *2DS2*) (153).

Con el **modelo de incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)** los resultados del análisis univariable mostraron una tendencia a la asociación

entre pareja D/R potencialmente alorreactiva con mayor incidencia tanto de EICRa I-IV (IA 65,05% vs. 51,01;  $p=0,093$ ) como de EICRa II-IV (IA 43,33% vs. 31,15;  $p=0,094$ ). No obstante, al no alcanzar significación estadística, concluimos que la **predicción de alorreactividad mediante este modelo no parece tener efecto clínico en nuestra serie de receptores sometidos a haplo-TPH**. El efecto beneficioso de la incompatibilidad ligando-ligando se describió originariamente (por Ruggeri *et al.*, 1999 y 2002) en receptores de haplo-TPH cuando se utilizaban dosis altas de PH CD34+ después de una depleción *ex-vivo* de células T del inóculo para prevenir la EICR, sin requerir inmunosupresión adicional posterior al trasplante (39,196). Por el contrario, el 100% de los pacientes de nuestro estudio recibieron injertos no manipulados. Tampoco encuentran impacto en los resultados del TPH con este modelo de predicción: Farag *et al.*, 2006, al estudiar 1571 alo-TPH de DNE en pacientes con patología mieloide (194); Solomon *et al.*, 2018, al estudiar retrospectivamente 208 haplo-TPH con CFM-post (152); ni el propio Ruggeri *et al.*, 2021. En este último estudio, la alorreactividad NK según el modelo ligando-ligando no tuvo efecto en la supervivencia libre de recaída/EICR si el haplo-TPH era no manipulado (HR 1,66 (0,9–3,1);  $p = 0,1$ ); sin embargo, sí mostró beneficio en la misma en trasplantes con depleción de células T *ex-vivo* (HR 0,6;  $p=0,14$ , interacción entre el grupo manipulado y no,  $p < 0,001$ ) (195). (197).

De la misma forma, **tampoco se encontró asociación significativa con la evolución del trasplante cuando se analizaron los otros dos modelos de predicción de alorreactividad asociada a la incompatibilidad HLA D/R**, es decir, el modelo **de incompatibilidad receptor-ligando (Memphis) y ausencia de ligando KIR en receptor**. Hay que tener en cuenta que este último modelo es una aproximación al modelo receptor-ligando (Memphis) que se utilizó en un momento concreto en el que los laboratorios de Histocompatibilidad no disponían de tipaje *KIR* (tecnología más reciente que la

del tipaje HLA por biología molecular). Este modelo asume que todos los genes KIR están presentes en el 100% de la población. Sin embargo, esto no es cierto para el caso de la alorreactividad mediada por el *KIR2DL1* (97% de la población general) o el *KIR3DL1* (90% de la población) (198).

Con los datos observados, la alorreactividad NK no parece determinante en la selección del mejor donante en el haplo-TPH con injerto no manipulado y utilizando CFM-post. Esto coincide con lo descrito por Ruggeri *et al.* 2021 (197). Actualmente hay evidencia científica que orienta a que altas dosis de CFM-post puede minimizar o mitigar el efecto beneficioso de la alorreactividad NK observado en el modelo de haplo-TPH con depleción de células T. Esto viene en parte apoyado por la demostración de la pérdida de la mayoría de las células NK maduras infundidas con haplo-TPH no manipulados y tras la administración de CFM-post, lo que supuestamente reduciría la potencial acción alorreactiva de las células NK del donante sobre el receptor (199). Por tanto, los beneficios asociados a la CFM-post, como son la sencillez del procedimiento y la reducción de incidencia de la EICR moderada-severa (96,153), se ven contrarrestados por la potencial pérdida de la alorreactividad NK (197,199). No obstante, en el estudio de Solomon *et al.*, 2018 (con 208 haplo-TPH asociados a CFM-post) el modelo de predicción de alorreactividad por incompatibilidad receptor-ligando se asoció con mejor SG (HR, 0,63; p=0,050) y mejor SLE (HR 0,57; p=0,012) (153).

Cuando se analizaron los modelos de predicción de alorreactividad que tienen en cuenta sólo el genotipo *KIR* de donante o de donante y receptor, se observó que aunque **el modelo de incompatibilidad *KIR-KIR* (Nantes)** entre D y R **tampoco tuvo efecto significativo en la evolución del trasplante, sí lo tuvo el modelo del haplotipo *KIR* o grupo *KIR-B* de donante (Stanford)**. Así, los **donantes** con menor contenido en genes *KIR B*

**catalogados como “neutrales”** según la clasificación de Cooley (49) **se asociaron** en nuestro análisis univariable **con menor MNRR** (IA del 23,03% frente al 50,47% en el grupo “*Better o Best*”;  $p=0,004$ ). Aunque, en el estudio de Cooley *et al.* 2010, donde 1409 pacientes con LMA o LLA fueron sometidos alo-TPH no manipulado, el grupo KIR-B del donante no mostró efecto en la MNRR ni en la ECIRa ni EICRc. En cambio, sí que se observó un menor riesgo relativo (RR) de recaída en los donantes catalogados como *Better* (RR 0,64;  $p=0,003$ ) o *Best* (RR 0,33;  $p<0,001$ ), respectivamente. Además, aquellos donantes clasificados como *Best* condicionaron una mejor SLE (RR 0,7;  $p=0,007$ ) (49). Los hallazgos de Cooley solo se observaron en los pacientes con LMA pero no se reprodujeron en aquellos con LLA (49). Sin embargo, en el análisis univariable de nuestra serie **si el donante pertenecía a los grupos KIR-B *Better* o *Best* se asoció a peor SLE** (HR 1,91;  $p=0,021$ ), en particular cuando el donante fue catalogado como “*Best*” (HR 2,05;  $p=0,046$ ). Asimismo, en el análisis multivariable de nuestro estudio, un ***B-content score* de 1 en el donante se relacionó con mejor SLE** (HR 0,48;  $p=0,048$ ). En el análisis univariable, **un mayor *B-content score* del donante** (0 vs. 1 vs.  $\geq 2$ ) **supuso una mayor incidencia de MNRR** (18,45% vs. 25,60% vs. 50,47%;  $p=0,016$ ). Por el contrario, en el estudio de Cooley *et al.*, 2011 un *B-content score* del donante de 1 no demostró efecto en la SLE (RR 0,94;  $p=0,45$ ) ni en la recaída (RR 0,93;  $p=0,45$ ) (49). El factor que se asoció con una menor recaída, en la serie de Cooley, fue el emplear donantes con *B-content score*  $\geq 2$  (RR 0,64;  $p=0,003$ ). Todas las disparidades enunciadas respecto a lo observado por Cooley *et al.*, 2010(49) se pueden deber a varios factores: primero, Cooley es a expensas de DNE HLA-idéntico o compatible (54% de los TPH ( $n=539$ ) tuvieron compatibilidad HLA  $\geq 9/10$ ); segundo, el régimen de acondicionamiento fue MA en el 100% de pacientes del estudio de Cooley frente al 29,2% de nuestro estudio; tercero, el modelo de Standford demostró tener efecto sólo en pacientes con LMA (disminución de la incidencia de recaída, mejorando la SLE



y SG ) mientras que nuestro estudio incluía un grupo heterogéneo de diagnósticos; cuarto, la serie de Cooley incluye pacientes más jóvenes, media de edad de 34 años, frente a los 54 años de la nuestra. Por último, la fuente de PH mayoritaria fue MO en la serie de Cooley (93% en el caso de LLA, y 59% en caso de LMA) frente al 87,6% de fuente de PH de la SP utilizada en nuestra serie. Como se ha referenciado previamente, existe evidencia científica que indica que la SP conduce a un mayor número de células T en el inóculo y que esto podría minimizar el papel de la alorreactividad NK (197,200). Asimismo, al analizar en el presente trabajo el subgrupo de pacientes con LMA los hallazgos no difirieron de los observados en la cohorte global. Con todo lo expuesto, se concluye que no son resultados extrapolables el escenario del trasplante HLA-idéntico vs. haplo-TPH.

**La SG** en nuestro estudio, dentro del análisis univariable, también **fue peor tanto si el donante pertenecía a cualquiera de los grupos KIR-B *Better* o *Best*** (HR 2,57; p=0,002), como si era catalogado por separado *Better* (HR 2,50; p=0,010) y *Best* (HR 2,66; p=0,009). En este sentido, Escudero *et al.*, obtuvieron en pacientes pediátricos con LA o LMC peor SG cuando el donante tuvo *B-content score*  $\geq 2$  o perteneciente al subgrupo catalogado como “*Better* o *Best*” (p=0,041 y p=0,029, respectivamente) y menor probabilidad de SLE (p<0,001) aunque analizaron alo-TPH con depleción de células T (201). En la investigación de Bastos-Oreiro, sobre haplo-TPH con CFM-post, los pacientes que recibieron injertos de donantes con mayor contenido en genes *KIR-B* (*B-content score*  $\geq 3$ ) no presentaron un beneficio en la supervivencia en relación con aquellos que recibieron donantes con *B-content score* de 0, 1 o 2 (IA de mortalidad HR 1,2 (0,7-1,9); IA de recaída HR 1,4 (0,93-2,1) e IA de mortalidad tóxica HR 1,15 (0,86-1,53)) (202).

Continuando con información contenida dentro del modelo del haplotipo KIR o grupo KIR-B donante (Standford), en el presente trabajo, dentro de los posibles genes centroméricos, se analizó la presencia o ausencia del gen *2DS2* por ser este un gen activador cuyo ligando de activación parece que se puede expresar en células leucémicas (49), lo que pudiera producir un efecto antitumoral. La **presencia en el donante del gen *2DS2*** mostró ser un **factor independiente asociado a peor SG** (HR 3,81; p= 0,035) en el análisis multivariable. Este hecho tampoco coincide con lo hallado por Cooley *et al.*, 2010 donde los donantes con centrómero BB (que por definición incluye al gen *2DS2*) ofrecieron menor riesgo de recaída del paciente que aquellos con donantes con centrómero AA (RR 0,34; p<0,001)(49). Las diferencias existentes entre el estudio de Cooley y el nuestro se han argumentado ya previamente. Lo que incide de nuevo en que el escenario del DNE HLA-idéntico no es extrapolable al del haplo-TPH. Asimismo, Solomon *et al.*, 2018, mostraron que el haplotipo KIR-B/x del donante con presencia de *2DS2* implicó mejor SG (HR 0,43; p=0,005) y SLE (HR 0,45; p=0,003) cuando se comparaba con los donantes con haplotipo A/A y también al comparar con los donantes con haplotipo B/x sin presencia de *2DS2* (HR 0,42; p=0,005) (153). Además estas mejoras en la supervivencia fueron a expensas de reducir tanto la recaída/progresión (haplotipo KIR-B/x del donante con presencia del gen *2DS2* (HR 0,43; p=0,024) vs. haplotipo KIR-B/x del donante con ausencia del gen *2DS2*), como la MNRR (haplotipo KIR del donante A/A vs. Bx con *2DS2* (HR 5,74; p=0,001) y haplotipo KIR B/x del donante sin *2DS2* (HR 3,76; p=0,039)) (153). Si el donante tiene genes *KIR* del haplotipo B/x, esto implica la presencia de genes *KIR* activadores (como el gen *2DS2*) que promueven la expansión de células NK. A diferencia de los donantes con haplotipo KIR A/A donde predomina la presencia de genes *KIR* inhibitorios, que promueven una mejor recuperación de los linfocitos T (201). Teniendo en cuenta esto, una posible hipótesis que podría explicar que un donante con el gen *2DS2* confiera peor SG

en el haplo-TPH no manipulado con CFM-post podría asociarse a una disminución de la alorreactividad NK comparando con los haplo-TPH con depleción de células T (197,199) y además, el hecho de que en nuestra serie la fuente de PH más empleada fuera la SP, con una mayor cantidad de células T en el inóculo (172), podría justificar una menor evidencia del efecto de alorreactividad de células NK. Esto podría incrementar el efecto injerto contra tumor, por facilitar la reconstitución inmune de tipo T, pero la presencia en el donante del gen *2DS2* podría implicar una respuesta “excesiva” en la dirección *GvH* que pudiera suponer una actividad citotóxica exagerada que llegara a condicionar la supervivencia en términos de incrementar la mortalidad. Estudios funcionales serían necesarios para profundizar esta hipótesis. Alternativamente, como el gen *2DS2* está en fuerte desequilibrio de ligamiento con el gen inhibitorio *2DL2* (74), pudiera ser que en el contexto del haplo-TPH no manipulado con CFM-post se contrarrestaran los efectos o incluso fuera más marcado el efecto inhibitorio de *2DL2*.

Otro resultado estadísticamente significativo que se obtuvo en el estudio univariable fue **que aquellos donantes cuyo telómero era BB tuvieron peor SLE (HR 4,36; p=0,007) y SG (HR 5,21; p=0,003) comparándolos frente a los donantes con telómero AA. Asimismo, los donantes con telómero AA presentaron menor incidencia de MNRR que los que lo tenían Bx (IA 21,09 % vs. 50,16%; p=0,021).** Esto va en consonancia con la hipótesis planteada en el párrafo anterior donde a mayor cantidad de genes *KIR* activadores, en nuestro caso especialmente a nivel telomérico, puedan implicar peor resultado en el trasplante.

Para valorar si el genotipo *KIR* del receptor tenía alguna influencia en la evolución del trasplante, se evaluaron todos los parámetros relacionados con el mismo centrándonos ahora en el paciente. Un ***B-content score en receptor***

≥2 (es decir, receptores con puntuación según esta herramienta que sea de 2 a 4) tienen **peor SG** (HR 3,12; p =0,002) **y SLE** (HR 3,53; p=0,005), tanto en el estudio uni como multivariable. Además, el **genotipo KIR en el receptor Bx (es decir, AB y/o BB) se asoció**, en el análisis univariable, **a peor SLE** (HR 2,16; p=0,047) **y SG** (HR 3,18; p=0,015). Una posible hipótesis para explicar estos hallazgos podría ser que al utilizar mayoritariamente AIR, la persistencia residual de células NK del receptor con mayor cantidad de genes *KIR* activadores en el paciente, produciría ese “exceso” de activación en dirección *HvG* que pudiera resultar deletérea. Otra opción sería que, como se trata de haplo-TPH, si el receptor KIR del paciente no encuentra su ligando HLA en las células del donante, según la teoría de *missing-self* las células NK del receptor podrían reconocer y atacar a las células del injerto y provocar el fallo del injerto o injerto pobre con aumento de la morbimortalidad. Esta funcionalidad se vería potenciada por mayor contenido de genes *KIR* activadores en el receptor. Esta hipótesis se podría cumplir en el caso de que el gen activador fuera *2DS1* en el paciente cuyo ligando conocido es HLA de grupo C2, en el caso de que estuviera ausente en el donante. Aunque actualmente no se conocen los ligandos de la mayoría de genes activadores, como es el caso del analizado *2DS2*. Por ello no se puede descartar que pueda tener un mecanismo similar a la hipótesis planteada para el gen *2DS1*. Estudios recientes muestran que las células NK del donante que aparecen precozmente tras haplo-TPH y que expresan KIR para el HLA no propio, pese a no estar educadas son hiperreactivas sin necesidad de encontrar ligando específico. Esto podría deberse a su entorno inflamatorio in vivo (radiación, quimioterapia, infecciones) que podrían anular el proceso educativo (57).

Por otro lado, en caso de **compatibilidad del genotipo KIR D/R (AB/AB) se asoció con menor SLE** (HR 3,34; p=0,046) **y SG** (HR 4,45; p=0,041). No obstante, son necesarios más estudios que incluyan mayor

número de pacientes para corroborar estos resultados. En ulteriores estudios sería interesante conocer el impacto clínico del *B-content score* tras haplo-TPH considerando simultáneamente la pareja D/R categorizándolas en grupos: *B-content score*  $\geq 2D/\geq 2R$ ; *B-content score*  $1D/\geq 2R$ ; *B-content score*  $\geq 2D/1R$  frente a *B-content score*  $1D/1R$ , ya que puede ser que los resultados que observamos en este estudio se deban al análisis exclusivamente en el donante, de modo aislado, o en el receptor pero no en la interacción de ambos.

Por último, al valorar los eventos acontecidos tras el haplo-TPH, observamos que el **desarrollo de EICRa grado III-IV se asoció con mayor MNRR** (HR 7,87;  $p=6,05^{-9}$ ), **menor SLE** (HR 5,41;  $p=1,48^{-9}$ ) **y SG** (HR 7,29;  $p=4,05^{-11}$ ). Por otro lado, **aquellos que presentaron EICRc tuvieron protección frente a la MNRR** (HR 3,15<sup>-8</sup>;  $p=2,00^{-16}$ ). Chevallier *et al.*, 2021, concluyen que el desarrollo de EICRa cutáneo grado II es un factor de buen pronóstico en cuanto a supervivencia en el haplo-TPH de SP con CFM-post (203). El grupo de Baltimore analizando 298 alo-TPH de DE HLA compatible con CFM-post utilizando como fuente de PH la MO, obtienen resultados similares, la EICRa grado II mejora la SG (HR 0,58;  $p=0,01$ ) y SLE (HR 0,50;  $p<0,001$ ) (204,205). No obstante, el grupo italiano, liderado por Bacigalupo, utilizando MO como fuente de PH, no observan impacto de la ECIRa grado II en los eventos del haplo-TPH (206).

En cuanto al **fallo de injerto primario mieloide** fue, en el análisis univariable, **factor de riesgo tanto para la SLE** (HR 3,09;  $p=0,017$ ) **como para la SG** (HR 3,66 (1,43-9,33;  $p=0,007$ )). El **fallo de injerto primario en plaquetas** también fue **factor de riesgo para la SLE** (HR 2,44;  $p=0,004$ ) **y la SG** (HR 2,98;  $p=0,002$ ). Estos datos, que concuerdan con publicaciones previas (207), tienen interés como marcadores predictivos, en este caso, de peor supervivencia.

Esta investigación se ha realizado gracias a un proyecto FIS concedido, en el año 2015. Desde entonces hasta ahora existen numerosas publicaciones sobre la materia pero, como se ha ido detallando previamente, continúan obteniéndose resultados contradictorios sobre el papel de la alorreactividad NK en el haplo-TPH (96,153,155,156,158,208). En gran parte puede deberse a la heterogeneidad de las distintas hemopatías malignas que precisan TPH, a la fuente de PH empleada, características intrínsecas del donante, así como el régimen de acondicionamiento empleado.

Como limitación principal de este estudio, pese a ser un multicéntrico prospectivo, es el tamaño muestral limitado y la inevitable variabilidad intercentro, incluyendo distintos regímenes de acondicionamiento que pueden influir en la evolución del trasplante. Además, está la variación intracentro representada por factores como la heterogeneidad de las patologías estudiadas, los distintos estados de la enfermedad en el momento del haplo-TPH, o los tratamientos administrados previamente pueden influir en los resultados observados. Finalmente, hay que considerar la variación interindividual de los pacientes y su respuesta inmunitaria (concretamente, por lo que respecta a esta tesis, la funcionalidad de las células NK).

Son necesarios más estudios que incluyan un mayor número de pacientes y utilicen una metodología lo más homogénea posible para confirmar los resultados obtenidos en esta investigación que pueden contribuir a mejorar la selección del donante de haplo-TPH. Por ejemplo, estudios con mayor número de pacientes podrían demostrar el impacto de variables que en nuestro estudio únicamente han mostrado significación estadística en el análisis univariable, como que el donante varón pueda ofrecer protección frente a la recaída, que el incremento en la disparidad HLA en dirección *GvH* pueda disminuir la MNRR o que el donante con telómero BB pueda mejorar la SLE.

Sería deseable que a raíz de esta investigación pudieran generarse nuevas hipótesis y estudios tales como el análisis del papel del contenido de genes *KIR-B* en el donante, en el receptor y la interrelación en la pareja D/R. Todo ello en el contexto de haplo-TPH no manipulado sometido al uso de CFM-post.





## **Conclusiones**



## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados de esta investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones del uso de haplo-TPH no manipulado asociado al uso de CFM-post como profilaxis para la EICR en pacientes hematológicos:

### 1. Impacto de la alorreactividad en los principales eventos post-TPH:

**1.1.** La predicción de alorreactividad NK mediante los modelos de incompatibilidad ligando-ligando, receptor-ligando, ausencia de ligando KIR en el receptor e incompatibilidad *KIR-KIR* no han mostrado efecto en los eventos de interés analizados (EICRa, EICRc, MNRR, SLE y SG).

**1.2.** El modelo de haplotipo KIR o grupo KIR-B donante (Standford), así como el contenido de genes *KIR-B* (*B-content score*) aportan datos con relevancia clínica.

- *B-content score* en el donante de 1 se relaciona con protección frente a la SLE, comparándolo con aquellos con *B-content score* de 0.
- El gen *2DS2* expresado en el donante es un factor de riesgo independiente que empeora la SG.
- Un *B-content score* en el paciente mayor o igual a 2 se asocia con peor SLE y SG.

### 2. Criterios clínicos preferibles para seleccionar al mejor donante:

**2.1.** La edad menor de 40 años y donante CMV seropositivo, cuando el paciente es CMV seropositivo, previenen el desarrollo de EICRa grado II-IV sin tener repercusión sobre la supervivencia.

2.2. Ni el sexo del donante, ni la relación de parentesco, ni la compatibilidad ABO entre donante y receptor han tenido repercusión clínica respecto al desarrollo de: EICRa, EICRc, recaída, MNRR, SLE ni SG.

2.3. La enfermedad de base en estadio avanzado es factor de riesgo tanto de recaída como de MNRR, mientras que estar en RC en el momento del haplo-TPH se asocia con menor MNRR.

2.4. El uso de PH obtenidos de SP, comparándolo frente a la MO, se asocia con mayor riesgo de desarrollar ECIRa II-IV, sin tener impacto en la supervivencia.

2.5. La compatibilidad HLA en dirección  $GvH \geq 6/10$  previene la recaída.

### 3. Análisis descriptivo del sistema HLA de los pacientes:

3.1. La distribución de frecuencias HLA de la cohorte de pacientes es representativa de la población española, tanto en individuos sanos como afectados de hemopatías malignas, siendo los alelos más prevalentes (con frecuencias superiores al 5%): para el *locus HLA-A*: \*02:01, \*01:01, \*03:01, \*24:02, \*11:01 y \*29:02; para el *locus HLA-C*: \*07:01, \*04:01, \*05:01, \*07:02, \*16:01, \*06:02, \*12:03, \*08:02 y \*02:02; para el *locus HLA-B*: \*18:01, \*51:01, \*44:03, \*14:02; para el *locus HLA-DRB1*: \*07:01, \*03:01, \*15:01, \*01:01, \*11:01 y \*01:02; para el *locus HLA-DQB1*: \*03:01, \*05:01, \*02:02, \*02:01, \*03:02 y \*06:02.

3.2. El *locus HLA-B* presenta la mayor diversidad alélica y el *locus HLA-DQB1* la menor, siendo *HLA-C* y *-DQB1* los *loci* que muestran una selección equilibrada más pronunciada. No se ha hallado ningún *loci*, de los estudiados, donde exista selección direccional.

**3.3.** Las asociaciones HLA con mayor desequilibrio de ligamiento en clase I son *C\*07:02~B\*07:02* y *C\*08:02~B\*14:02* (frecuencia de ambas superior al 6%), mientras que en clase II son *DRB1\*07:01~DQB1\*02:02* y *DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (frecuencia superior al 9%).

**4. Análisis de frecuencias del sistema KIR en los pacientes:**

**4.1.** La distribución de genotipos *KIR* en la cohorte de pacientes si bien se aproxima a la referenciada en población española sana en sus genotipos más prevalentes, 1, 2 y 4 (frecuencias superiores al 10%), se desvía en el caso del genotipo 3, que aparece con frecuencia inferior a la esperada.

**5. Análisis descriptivo de la existencia de potencial alorreactividad NK en las parejas D/R de esta cohorte:**

**5.1.** La distribución de frecuencias según los diferentes modelos de predicción fue: 35,4% con el de incompatibilidad ligando-ligando; 83,2% con el de incompatibilidad receptor-ligando; 65,5% con del ausencia de ligando *KIR* en receptor; 62,8% con el de incompatibilidad *KIR-KIR* y 38,1% con el de haplotipo *KIR* del donante.

**6. Análisis del impacto de la alorreactividad NK en los eventos pos-TPH en pacientes con diagnóstico de LMA:**

**6.1.** El análisis del subgrupo de pacientes con LMA no muestra diferencias respecto a la serie global.



## **Bibliografía**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301-23.
2. Klein J, Satta Y, O'hUigin C, Takahata N. The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:269-95.
3. Tauber AI, Podolsky SH. The generation of diversity: clonal selection theory and the rise of molecular immunology. Cambridge (Mass.): Harvard University Press; 2000.
4. Raju TN. The Nobel chronicles. 1980: George Davis Snell (1903-96); Jean Baptiste Dausset (b 1916); Baruj Benacerraf (b 1920). *Lancet.* 13 de noviembre de 1999;354(9191):1738.
5. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* diciembre de 2004;5(12):889-99.
6. Viguier JM. Manual CTO de medicina y cirugía. Inmunología y Genética. Vols. 11 y 12. Madrid: CTO Medicina : McGraw-Hill Interamericana; 2007.
7. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* enero de 2015;43(Database issue):D423-431.
8. Kendall E, Sargent CA, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains a new cluster of genes between the HLA-D and complement C4 loci. *Nucleic Acids Res.* 25 de diciembre de 1990;18(24):7251-7.
9. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:587-622.
10. Persson K, Schneider G. Three-dimensional structures of MHC class I-peptide complexes: implications for peptide recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000;48(3):135-42.
11. Wilson IA, Fremont DH. Structural analysis of MHC class I molecules with bound peptide antigens. *Semin Immunol.* abril de 1993;5(2):75-80.

12. Wang E, Adams S, Stroneck DF, Marincola FMW. Human leukocyte antigen and human neutrophil antigen systems. *Transfusion Medicine*. Vol. 114. 2012. 1659-1671 p.
13. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 1 de julio de 1993;364(6432):33-9.
14. Schafer PH, Pierce SK, Jardetzky TS. The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Semin Immunol*. diciembre de 1995;7(6):389-98.
15. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. abril de 2010;75(4):291-455.
16. Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG. IMGT/HLA database-- a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. marzo de 2000;55(3):280-7.
17. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. enero de 2016;13(1):10-24.
18. Mack SJ, Gourraud PA, Single RM, Thomson G, Hollenbach JA. Analytical methods for immunogenetic population data. *Methods Mol Biol*. 2012;882:215-44.
19. Robinson J, Guethlein LA, Cereb N, Yang SY, Norman PJ, Marsh SGE, et al. Distinguishing functional polymorphism from random variation in the sequences of >10,000 HLA-A, -B and -C alleles. *PLoS Genet*. junio de 2017;13(6):e1006862.
20. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2020;48(D1):D948-55.
21. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:181-207.
22. Jackson MR, Peterson PA. Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules. *Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:207-35.
23. Solheim JC. Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol Rev*. diciembre de 1999;172:11-9.

24. López-Martínez A, Chávez-Muñoz C, Granados J. Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. *Revista de investigación clínica*. abril de 2005;57(2):132-41.
25. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:259-93.
26. Carretero R, Gil-Julio H, Vázquez-Alonso F, Garrido F, Castiñeiras J, Cózar JM. Involvement of HLA class I molecules in the immune escape of urologic tumors. *Actas Urol Esp*. abril de 2014;38(3):192-9.
27. Hansen JA, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos B, Thomas ED. Marrow transplantation from donors other than HLA identical siblings. *Hum Immunol*. febrero de 1981;2(1):31-40.
28. Powles RL, Morgenstern GR, Kay HE, McElwain TJ, Clink HM, Dady PJ, et al. Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *Lancet*. 19 de marzo de 1983;1(8325):612-5.
29. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, et al. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol*. mayo de 1997;15(5):1767-77.
30. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*. diciembre de 2006;214:202-18.
31. Memoria Anual REDMO 2020 by Fundación Josep Carreras contra la Leucemia / José Carreras Leukaemia Foundation - Issuu [Internet]. [citado 2 de marzo de 2022]. Disponible en: [https://issuu.com/fundacionjosepcarreras/docs/memoria\\_2020\\_cast\\_web](https://issuu.com/fundacionjosepcarreras/docs/memoria_2020_cast_web)
32. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res*. abril de 2012;71(4 Pt 2):418-26.
33. Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol*. diciembre de 2012;39(6):683-93.
34. Parmesar K, Raj K. Haploidentical Stem Cell Transplantation in Adult Haematological Malignancies. *Adv Hematol*. 2016;2016:3905907.
35. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, et al. T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for

- hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol*. 1 de abril de 2013;31(10):1310-6.
36. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editores. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado 6 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5>
  37. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*. septiembre de 1986;68(3):770-3.
  38. Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor alloreactive T lymphocytes. *Transplantation*. junio de 1987;43(6):842-7.
  39. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 15 de marzo de 2002;295(5562):2097-100.
  40. Pan L, Delmonte J, Jalonen CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 15 de diciembre de 1995;86(12):4422-9.
  41. Zeng D, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Granulocyte colony-stimulating factor reduces the capacity of blood mononuclear cells to induce graft-versus-host disease: impact on blood progenitor cell transplantation. *Blood*. 1 de julio de 1997;90(1):453-63.
  42. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. agosto de 2006;38(4):291-7.
  43. Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature*. 13 de junio de 1959;183(4676):1682-3.

44. Berenbaum MC, Brown IN. PROLONGATION OF HOMOGRAFT SURVIVAL IN MICE WITH SINGLE DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE. *Nature*. 5 de octubre de 1963;200:84.
45. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. junio de 2008;14(6):641-50.
46. Kwon M, Bailén R, Díez-Martín JL. Evolution of the role of haploidentical stem cell transplantation: past, present, and future. *Expert Rev Hematol*. agosto de 2020;13(8):835-50.
47. Al-Homsi AS, Roy TS, Cole K, Feng Y, Duffner U. Post-transplant high-dose cyclophosphamide for the prevention of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2015;21(4):604-11.
48. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, Kowalski J, Tsai HL, Bolaños-Meade J, et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2010;16(4):482-9.
49. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 7 de octubre de 2010;116(14):2411-9.
50. Leung W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br J Haematol*. octubre de 2011;155(1):14-29.
51. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer*. 2013;4(1):25-35.
52. Jiao Y, Huntington ND, Belz GT, Seillet C. Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2016;7:426.
53. Narni-Mancinelli E, Vivier E, Kerdiles YM. The «T-cell-ness» of NK cells: unexpected similarities between NK cells and T cells. *Int Immunol*. julio de 2011;23(7):427-31.

54. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* diciembre de 2011;46(4):216-28.
55. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-74.
56. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the «missing self»: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* julio de 1990;11(7):237-44.
57. Dhuyser A, Aarnink A, Pérès M, Jayaraman J, Nemat-Gorgani N, Rubio MT, et al. KIR in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Need for a Unified Paradigm for Donor Selection. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2022 [citado 30 de junio de 2022];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2022.821533>
58. Rajalingam R. The Impact of HLA Class I-Specific Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors on Antibody-Dependent Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity and Organ Allograft Rejection. *Front Immunol.* 2016;7:585.
59. Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity.* septiembre de 2001;15(3):363-74.
60. Kuroki K, Furukawa A, Maenaka K. Molecular recognition of paired receptors in the immune system. *Front Microbiol.* 2012;3:429.
61. Barquera DTGR. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. 2008;21(1):9.
62. Dupont B, Selvakumar A, Steffens U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. *Tissue Antigens.* junio de 1997;49(6):557-63.
63. Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens.* octubre de 1996;48(4 Pt 1):285-94.
64. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, Zahurak M, Jones RJ, Fuchs EJ. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* abril de 2010;16(4):533-42.

65. Muntasell A, López-Botet M. Natural Killer Cell-Based Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia: Lessons for the Future. *Clin Cancer Res.* 15 de abril de 2016;22(8):1831-3.
66. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-51.
67. Gómez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics.* agosto de 2002;54(5):314-9.
68. Espeli M, Niederer HA, Traherne JA, Trowsdale J, Smith KG. Genetic variation, Fcγ receptors, KIRs and infection: the evolution of autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* diciembre de 2010;22(6):715-22.
69. Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics.* abril de 2000;51(4-5):268-80.
70. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene.* 23 de junio de 2004;335:121-31.
71. IPD-KIR Database [Internet]. [citado 2 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>
72. Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol.* 1 de marzo de 2002;168(5):2307-15.
73. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol.* 1 de julio de 2002;169(1):239-47.
74. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* enero de 2010;129(1):8-19.
75. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med.* 4 de abril de 2005;201(7):1025-9.
76. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* diciembre de 2008;20(6):343-52.

77. Mehta RS, Rezvani K. Can we make a better match or mismatch with KIR genotyping? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2 de diciembre de 2016;2016(1):106-18.
78. Sabouri Ghannad M, Research Center for Molecular Medicine, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran, Hajilooi M, Immunology Department, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran, Solgi G, Immunology Department, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. HLA-KIR Interactions and Immunity to Viral Infections. *Res Mol Med (RMM)*. 1 de febrero de 2014;2(1):1-20.
79. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179.
80. van Bergen J, Trowsdale J. Ligand specificity of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors: a brief history of KIR. *Front Immunol*. 2012;3:394.
81. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol*. octubre de 2008;20(5):581-7.
82. Rettman P, Willem C, Volteau C, Legrand N, Chevallier P, Lodé L, et al. Impact of Graft-Versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Transplantation*. septiembre de 2017;101(9):2092-101.
83. Lutz CT. Human leukocyte antigen Bw4 and Bw6 epitopes recognized by antibodies and natural killer cells. *Curr Opin Organ Transplant*. agosto de 2014;19(4):436-41.
84. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 15 de septiembre de 2002;100(6):1935-47.
85. Barao I, Murphy WJ. The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection. *Biol Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2003;9(12):727-41.
86. Heidenreich S, Kröger N. Reduction of Relapse after Unrelated Donor Stem Cell Transplantation by KIR-Based Graft Selection. *Front Immunol*. 2017;8:41.



87. Bessoles S, Grandclément C, Alari-Pahissa E, Gehrig J, Jeevan-Raj B, Held W. Adaptations of Natural Killer Cells to Self-MHC Class I. *Front Immunol.* 2014;5:349.
88. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 22 de marzo de 2012;12(4):239-52.
89. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol.* 1 de enero de 2004;172(1):644-50.
90. Lotze MT, Thomson AW. *Natural killer cells: basic science and clinical application.* Amsterdam Boston: Elsevier/Academic Press; 2010.
91. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* 15 de junio de 2005;105(12):4878-84.
92. Beksaç M, Dalva K. Role of killer immunoglobulin-like receptor and ligand matching in donor selection. *Bone Marrow Res.* 2012;2012:271695.
93. Gagne K, Brizard G, Gueglio B, Milpied N, Herry P, Bonneville F, et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol.* abril de 2002;63(4):271-80.
94. Mehta RS, Oran B. The Optimal Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Donor-We Can Recognize, but Can We Search? *Biol Blood Marrow Transplant.* enero de 2019;25(1):e3-4.
95. Ciurea SO, Champlin RE. Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies. *Biol Blood Marrow Transplant.* febrero de 2013;19(2):180-4.
96. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Fuchs EJ, Luznik L, Huang XJ, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* enero de 2020;55(1):12-24.
97. Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:230-6.

98. Seebach JD, Stussi G, Passweg JR, Loberiza FR, Gajewski JL, Keating A, et al. ABO Blood Group Barrier in Allogeneic Bone Marrow Transplantation Revisited. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. diciembre de 2005;11(12):1006-13.
99. Logan AC, Wang Z, Alimoghaddam K, Wong RM, Lai T, Negrin RS, et al. ABO mismatch is associated with increased nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2015;21(4):746-54.
100. Armand P, Gibson CJ, Cutler C, Ho VT, Koreth J, Alyea EP, et al. A disease risk index for patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 26 de julio de 2012;120(4):905-13.
101. Armand P, Kim HT, Logan BR, Wang Z, Alyea EP, Kalaycio ME, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 5 de junio de 2014;123(23):3664-71.
102. Barba P, Piñana JL, Martino R, Valcárcel D, Amorós A, Sureda A, et al. Comparison of two pretransplant predictive models and a flexible HCT-CI using different cut off points to determine low-, intermediate-, and high-risk groups: the flexible HCT-CI Is the best predictor of NRM and OS in a population of patients undergoing allo-RIC. *Biol Blood Marrow Transplant*. marzo de 2010;16(3):413-20.
103. Matsuno N, Wake A, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, et al. Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. *Blood*. 20 de agosto de 2009;114(8):1689-95.
104. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*. enero de 2015;43(Database issue):D784-788.
105. Guerreiro M, Planelles D, Aguilar-Gallardo C, Lorenzo JI, Montoro J, Sanz J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in Spain: Human leukocyte antigen characteristics and diversity by high-resolution analysis. *HLA*. marzo de 2021;97(3):198-213.
106. The Allele Frequency Net Database [Search HLA Haplotype Frequencies] [Internet]. [citado 10 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp>

107. Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE. IPD—the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Research*. enero de 2010;38(suppl\_1):D863-9.
108. The Allele Frequency Net Database [KIR Genotype Reference] [Internet]. [citado 10 de noviembre de 2021]. Disponible en: [http://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp?kgen\\_pop\\_selection=&kgen\\_group=&kgen\\_id=&kgen\\_country=&kgen\\_pops\\_pattern=equal&kgen\\_pops=&kgen\\_dataset=&kgen\\_region=&kgen\\_ethnic=&kgen\\_study=&kgen\\_order=order\\_1&3DL1=1&2DL1=1&2DL3=1&2DS4=1&2DL2=&2DL5=&3DS1=&2DS1=&2DS2=&2DS3=&2DS5=&2DL4=1&3DL2=1&3DL3=&2DP1=1&3DP1=1](http://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp?kgen_pop_selection=&kgen_group=&kgen_id=&kgen_country=&kgen_pops_pattern=equal&kgen_pops=&kgen_dataset=&kgen_region=&kgen_ethnic=&kgen_study=&kgen_order=order_1&3DL1=1&2DL1=1&2DL3=1&2DS4=1&2DL2=&2DL5=&3DS1=&2DS1=&2DS2=&2DS3=&2DS5=&2DL4=1&3DL2=1&3DL3=&2DP1=1&3DP1=1)
109. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Santos EJMD, Jones J, Takeshita L, Ortega-Rivera ND, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2020;48(D1):D783-8.
110. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SGE. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*. enero de 2013;41(Database issue):D1234-1240.
111. Montoro J, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, Hernani R, Lorenzo I, Pérez A, et al. Uniform graft-versus-host disease prophylaxis with posttransplant cyclophosphamide, sirolimus, and mycophenolate mofetil following hematopoietic stem cell transplantation from haploidentical, matched sibling and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. noviembre de 2020;55(11):2147-59.
112. Medina D, Gonzales L, Davalos D, Rosales M, Estacio M, Manzi E. Trasplante de células madre hematopoyéticas en pacientes pediátricos con diagnóstico de neoplasias mieloides, experiencia en 15 años. *Revista Colombiana de Cancerología*. abril de 2018;22(2):69-75.
113. McCurdy SR, Muth ST, Tsai HL, Symons HJ, Huff CA, Matsui WH, et al. Early Fever after Haploidentical Bone Marrow Transplantation Correlates with Class II HLA-Mismatching and Myeloablation but Not Outcomes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. octubre de 2018;24(10):2056-64.
114. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. octubre de 1974;18(4):295-304.

115. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* junio de 1995;15(6):825-8.
116. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med.* agosto de 1980;69(2):204-17.
117. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* marzo de 2015;21(3):389-401.e1.
118. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 5 de enero de 2017;129(1):30-7.
119. Fuerst D, Mueller C, Beelen DW, Neuchel C, Tsamadou C, Schrezenmeier H, et al. Time-dependent effects of clinical predictors in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* febrero de 2016;101(2):241-7.
120. Fuerst D, Frank S, Mueller C, Beelen DW, Schetelig J, Niederwieser D, et al. Competing-risk outcomes after hematopoietic stem cell transplantation from the perspective of time-dependent effects. *Haematologica.* septiembre de 2018;103(9):1527-34.
121. Barrett AJ, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.* agosto de 2010;3(4):429-41.
122. Dalva K, Beksac M. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex™ technology. *Methods Mol Biol.* 2014;1109:87-99.
123. Dalva K, Beksac M. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology. *Methods Mol Med.* 2007;134:61-9.
124. Nam M, Jung K, Roh EY, Shin S, Park KU, Song EY. Evaluation of LabType-SSO HLA Typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci. *Clin Lab.* 1 de enero de 2021;67(1).

125. Bunce M, Passey B. HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol Biol.* 2013;1034:147-59.
126. Downing J, Guttridge MG, Thompson J, Darke C. Five-locus HLA typing of hematopoietic stem cell donor volunteers using PCR sequence specific primers. *Genet Test.* 2004;8(3):301-12.
127. Perng CL, Chang LF, Chien WC, Lee TD, Chang JB. Effectiveness and limitations of resolving HLA class I and class II by heterozygous ambiguity resolving primers (HARPs)--a modified technique of sequence-based typing (SBT). *Clin Biochem.* noviembre de 2012;45(16-17):1471-8.
128. Ehrenberg PK, Geretz A, Baldwin KM, Apps R, Polonis VR, Robb ML, et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics.* 6 de octubre de 2014;15:864.
129. Gabriel C, Fürst D, Faé I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, et al. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens.* febrero de 2014;83(2):65-75.
130. Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, Inoue I. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J Hum Genet.* noviembre de 2015;60(11):665-73.
131. Nong T, Saito K, Blair L, Tarsitani C, Lee JH. KIR genotyping by reverse sequence-specific oligonucleotide methodology. *Tissue Antigens.* abril de 2007;69:92-5.
132. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens.* octubre de 2000;56(4):313-26.
133. Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens.* noviembre de 2007;70(5):415-22.
134. Ordóñez D, Moraru M, Gómez-Lozano N, Cisneros E, Vilches C. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers. *Methods Mol Biol.* 2012;882:415-30.
135. Rajalingam R, Ashouri E. Gene-specific PCR typing of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Methods Mol Biol.* 2013;1034:239-55.

136. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol.* diciembre de 1999;60(12):1293-302.
137. Pei R, Wang G, Tarsitani C, Rojo S, Chen T, Takemura S, et al. Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol.* mayo de 1998;59(5):313-22.
138. Rizzo ML. *Statistical computing with R. Second Edition.* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2019. 474 p.
139. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association.* junio de 1958;53(282):457-81.
140. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* marzo de 1966;50(3):163-70.
141. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, et al. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet.* diciembre de 2012;39(6):459-72; quiz 473-6.
142. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A, HLA-net 2013 collaboration. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens.* mayo de 2014;83(5):307-23.
143. Nunes JM. Using unformat and gene[rates] to Analyze Data with Ambiguities in Population Genetics. *Evol Bioinform Online.* 2015;11(Suppl 2):19-26.
144. Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Single RM, Thomson G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput.* 2003;514-25.
145. Montero-Martín G, Mallempati KC, Gangavarapu S, Sánchez-Gordo F, Herrero-Mata MJ, Balas A, et al. High-resolution characterization of allelic and haplotypic HLA frequency distribution in a Spanish population using high-throughput next-generation sequencing. *Hum Immunol.* julio de 2019;80(7):429-36.

146. Bonferroni CE. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Seeber; 1936. 62 p.
147. Ludbrook J. Multiple inferences using confidence intervals. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* marzo de 2000;27(3):212-5.
148. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med.* 30 de marzo de 1999;18(6):695-706.
149. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological).* enero de 1972;34(2):187-202.
150. Fox J. Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data. :18.
151. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association.* junio de 1999;94(446):496-509.
152. Portet S. A primer on model selection using the Akaike Information Criterion. *Infect Dis Model.* 2020;5:111-28.
153. Solomon SR, Aubrey MT, Zhang X, Piluso A, Freed BM, Brown S, et al. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other Clinical Variables. *Biol Blood Marrow Transplant.* abril de 2018;24(4):789-98.
154. Torío A, Pascual MJ, Vidales I, Ortiz M, Caballero A, Heiniger AI. Donor Selection Based on Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genotype May Improve Outcome After T-Cell-Replete Haploidentical Transplantation. *Transplant Proc.* marzo de 2018;50(2):679-82.
155. Wang Y, Chang YJ, Xu LP, Liu KY, Liu DH, Zhang XH, et al. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? *Blood.* 7 de agosto de 2014;124(6):843-50.
156. How do we choose the best donor for T-cell-replete, HLA-haploidentical transplantation? - PubMed [Internet]. [citado 4 de enero de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27071449/>
157. consentimiento-informado\_105996.pdf [Internet]. [citado 30 de junio de 2022]. Disponible en: [https://www.fcarreras.org/consentimiento-informado\\_105996.pdf](https://www.fcarreras.org/consentimiento-informado_105996.pdf)

158. Wu Y, Lai X, Shi J, Tan Y, Zhao Y, Yu J, et al. Effect of donor characteristics on T cell-replete haploidentical stem cell transplantation over the last 10 years at a single institution. *Br J Haematol.* 3 de diciembre de 2021;
159. Canaani J, Savani BN, Labopin M, Huang XJ, Ciceri F, Arcese W, et al. Donor age determines outcome in acute leukemia patients over 40 undergoing haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* febrero de 2018;93(2):246-53.
160. Azevedo\* LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TMV, Campos SV, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo).* julio de 2015;70(7):515-23.
161. Styczynski J. Who Is the Patient at Risk of CMV Recurrence: A Review of the Current Scientific Evidence with a Focus on Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Ther.* marzo de 2018;7(1):1-16.
162. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood.* 15 de diciembre de 2003;102(13):4255-60.
163. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* noviembre de 2014;21(6):466-9.
164. Mariotti J, Bramanti S, Devillier R, Sarina B, Furst S, Granata A, et al. CMV-Seropositive Recipients Are at Higher Risk of CMV Reactivation and NRM after Haploidentical-SCT with PT-Cy. *Blood.* 13 de noviembre de 2019;134:4484.
165. Akahoshi Y, Kimura SI, Inamoto Y, Seo S, Muranushi H, Shimizu H, et al. Effect of Cytomegalovirus Reactivation With or Without Acute Graft-Versus-Host Disease on the Risk of Nonrelapse Mortality. *Clin Infect Dis.* 2 de agosto de 2021;73(3):e620-8.
166. Cesaro S, Crocchiolo R, Tridello G, Knelange N, Van Lint MT, Koc Y, et al. Comparable survival using a CMV-matched or a mismatched donor for CMV+ patients undergoing T-replete haplo-HSCT with PT-Cy for acute leukemia: a study of behalf of the infectious diseases and acute leukemia working parties of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* abril de 2018;53(4):422-30.



167. McCurdy SR, Zhang MJ, St Martin A, Al Malki MM, Bashey A, Gaballa S, et al. Effect of donor characteristics on haploidentical transplantation with posttransplantation cyclophosphamide. *Blood Adv.* 13 de febrero de 2018;2(3):299-307.
168. Crocchiolo R, Castagna L, Furst S, Devillier R, Sarina B, Bramanti S, et al. The patient's CMV serological status affects clinical outcome after T-cell replete haplo-HSCT and post-transplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.* agosto de 2016;51(8):1134-6.
169. Porrett PM. Biologic mechanisms and clinical consequences of pregnancy alloimmunization. *Am J Transplant.* mayo de 2018;18(5):1059-67.
170. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 27 de abril de 2006;354(17):1813-26.
171. Stern M, Brand R, de Witte T, Sureda A, Rocha V, Passweg J, et al. Female-versus-male alloreactivity as a model for minor histocompatibility antigens in hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Transplant.* octubre de 2008;8(10):2149-57.
172. Wang W, Huang H, Halagan M, Vierra-Green C, Heuer M, Brelsford JE, et al. Chromosome Y-encoded antigens associate with acute graft-versus-host disease in sex-mismatched stem cell transplant. *Blood Adv.* 9 de octubre de 2018;2(19):2419-29.
173. Kimura F, Sato K, Kobayashi S, Ikeda T, Sao H, Okamoto S, et al. Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica.* noviembre de 2008;93(11):1686-93.
174. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood.* 1 de octubre de 2001;98(7):2043-51.
175. Canaani J, Savani BN, Labopin M, Huang XJ, Ciceri F, Arcese W, et al. Impact of ABO incompatibility on patients' outcome after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica.* junio de 2017;102(6):1066-74.

176. Scholl S, Klink A, Mügge LO, Schilling K, Höffken K, Sayer HG. Safety and impact of donor-type red blood cell transfusion before allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation with major ABO mismatch. *Transfusion*. octubre de 2005;45(10):1676-83.
177. Santoro N, Labopin M, Ciceri F, Van Lint MT, Nasso D, Blaise D, et al. Impact of conditioning intensity on outcomes of haploidentical stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia 45 years of age and over. *Cancer*. 1 de mayo de 2019;125(9):1499-506.
178. Rubio MT, Savani BN, Labopin M, Piemontese S, Polge E, Ciceri F, et al. Impact of conditioning intensity in T-replete haplo-identical stem cell transplantation for acute leukemia: a report from the acute leukemia working party of the EBMT. *J Hematol Oncol*. 15 de marzo de 2016;9:25.
179. Srour SA, Saliba RM, Bittencourt MCB, Perez JMR, Kongtim P, Alousi A, et al. Haploidentical transplantation for acute myeloid leukemia patients with minimal/measurable residual disease at transplantation. *Am J Hematol*. diciembre de 2019;94(12):1382-7.
180. Norsworthy KJ, Gao X, Ko CW, Pulte ED, Zhou J, Gong Y, et al. Response Rate, Event-Free Survival, and Overall Survival in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: US Food and Drug Administration Trial-Level and Patient-Level Analyses. *J Clin Oncol*. 10 de marzo de 2022;40(8):847-54.
181. Sanz J, Galimard JE, Labopin M, Afanasyev B, Angelucci E, Ciceri F, et al. Post-transplant cyclophosphamide after matched sibling, unrelated and haploidentical donor transplants in patients with acute myeloid leukemia: a comparative study of the ALWP EBMT. *J Hematol Oncol*. 6 de mayo de 2020;13:46.
182. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. *N Engl J Med*. 18 de octubre de 2012;367(16):1487-96.
183. Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet*. 5 de junio de 1993;341(8858):1482.
184. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, Shaw BE, Barker JN, Burns LJ, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood*. 19 de septiembre de 2019;134(12):924-34.

185. 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*. 14 de enero de 2016;127(2):260-7.
186. Ciurea SO, Saliba RM, Rondon G, Patah PA, Aung F, Cano P, et al. Outcomes of patients with myeloid malignancies treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from matched unrelated donors compared with one human leukocyte antigen mismatched related donors using HLA typing at 10 loci. *Biol Blood Marrow Transplant*. junio de 2011;17(6):923-9.
187. Ash RC, Horowitz MM, Gale RP, van BD, Casper JT, Gordon-Smith EC, et al. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant*. 1 de junio de 1991;7(6):443-52.
188. 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*. 12 de febrero de 2015;125(7):1189-97.
189. Lorentino F, Labopin M, Fleischhauer K, Ciceri F, Mueller CR, Ruggeri A, et al. The impact of HLA matching on outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT is modulated by GVHD prophylaxis. *Blood Adv*. 25 de abril de 2017;1(11):669-80.
190. Bacigalupo A, Laurenti L. Identifying the Best Haploidentical Donor: Are We There? *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2018;24(4):638-40.
191. Raiola AM, Risitano A, Sacchi N, Giannoni L, Signori A, Aquino S, et al. Impact of HLA Disparity in Haploidentical Bone Marrow Transplantation Followed by High-Dose Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. enero de 2018;24(1):119-26.
192. Huo MR, Pei XY, Li D, Chang YJ, Xu LP, Zhang XH, et al. Impact of HLA allele mismatch at HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 on outcomes in haploidentical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. mayo de 2018;53(5):600-8.
193. Balas A, García-Sánchez F, Vicario JL. Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching. *Tissue Antigens*. enero de 2011;77(1):45-53.

194. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol*. julio de 2008;69(7):443-64.
195. Enrich E, Campos E, Martorell L, Herrero MJ, Vidal F, Querol S, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 allele and haplotype frequencies: An analysis of umbilical cord blood units at the Barcelona Cord Blood Bank. *HLA*. octubre de 2019;94(4):347-59.
196. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1 de julio de 1999;94(1):333-9.
197. Ruggeri L, Vago L, Eikema DJ, de Wreede LC, Ciceri F, Diaz MA, et al. Natural killer cell alloreactivity in HLA-haploidentical hematopoietic transplantation: a study on behalf of the CTIWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. agosto de 2021;56(8):1900-7.
198. Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Perruccio K, Aversa F, et al. Clinical impact of natural killer cell reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation. *Semin Immunopathol*. 1 de diciembre de 2008;30(4):489-503.
199. Russo A, Oliveira G, Berglund S, Greco R, Gambacorta V, Cieri N, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood*. 11 de enero de 2018;131(2):247-62.
200. Bishara A, De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens*. marzo de 2004;63(3):204-11.
201. Escudero A, Martínez-Romera I, Fernández L, Valentín J, González-Vicent M, Vicario JL, et al. Donor KIR Genotype Impacts on Clinical Outcome after T Cell-Depleted HLA Matched Related Allogeneic Transplantation for High-Risk Pediatric Leukemia Patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2018;24(12):2493-500.
202. Oreiro MB. Influencia de la alorreactividad KIR en el trasplante alogénico de progenitorres hematopoyéticos haploidentico, no manipulado. :93.

203. Chevallier P, Berceanu A, Peterlin P, Garnier A, Le Bourgeois A, Imbert BM, et al. Grade 2 acute GVHD is a factor of good prognosis in patients receiving peripheral blood stem cells haplo-transplant with post-transplant cyclophosphamide. *Acta Oncol.* abril de 2021;60(4):466-74.
204. McCurdy SR, Kanakry CG, Tsai HL, Gojo I, Smith BD, Gladstone DE, et al. Development of Grade II Acute Graft-versus-Host Disease Is Associated with Improved Survival after Myeloablative HLA-Matched Bone Marrow Transplantation using Single-Agent Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* junio de 2019;25(6):1128-35.
205. McCurdy SR, Kanakry CG, Tsai HL, Kasamon YL, Showel MM, Bolaños-Meade J, et al. Grade II Acute Graft-versus-Host Disease and Higher Nucleated Cell Graft Dose Improve Progression-Free Survival after HLA-Haploidentical Transplant with Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* febrero de 2018;24(2):343-52.
206. Bacigalupo A, Maria Raiola A, Dominietto A, Di Grazia C, Gualandi F, Lint MTV, et al. Graft versus host disease in unmanipulated haploidentical marrow transplantation with a modified post-transplant cyclophosphamide (PT-CY) regimen: an update on 425 patients. *Bone Marrow Transplant.* agosto de 2019;54(Suppl 2):708-12.
207. Valcárcel D, Sureda A. Graft Failure. En: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editores. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [citado 15 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553978/>
208. Bultitude WP, Schellekens J, Szydlo RM, Anthias C, Cooley SA, Miller JS, et al. Presence of donor-encoded centromeric KIR B content increases the risk of infectious mortality in recipients of myeloablative, T-cell deplete, HLA-matched HCT to treat AML. *Bone Marrow Transplant.* octubre de 2020;55(10):1975-84.



 **Anexos**





# 8. ANEXOS

## ANEXO I. CONCESIÓN DE LA BECA FIS

ROLDAN LOPEZ ALVARO - 2015-07-14 12:45:14 CET. Suplente del Subdirector General de Evaluación y Fomento de la Investigación (Resolución de 14 de mayo de 2015, de la Subdirectora General de Evaluación y Fomento de la Investigación, por la que se nombra a D. Roldán López Alvaro como suplente del Subdirector General de Evaluación y Fomento de la Investigación). Firmado por el Subdirector General de Evaluación y Fomento de la Investigación (Resolución de 14 de mayo de 2015, de la Subdirectora General de Evaluación y Fomento de la Investigación, por la que se nombra a D. Roldán López Alvaro como Subdirector General de Evaluación y Fomento de la Investigación). La autenticidad de este documento puede ser comprobada mediante el código electrónico: ZTJ7GUEYSS1SKRPL en <http://www.gap.mih.pq.gov.es>



AUTONOMÍA	CENTRO	CIF	EXPEDIENTE	TÍTULO	CONCEDIDO	1ª anualidad	2ª anualidad	3ª anualidad
COM. VALENCIANA	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/00090	Immunobiología de la infección por el citomegalovirus en el trasplante alógeno de precursores hematopoyéticos haploidéntico asociado al uso de ciclofosfamida posttrasplante	Total 98.815,00 €	60.500,00 €	18.785,00 €	19.380,00 €
	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/00837	Comparación aleatoria entre un estrategia de intervención sobre fragilidad frente a la estrategia habitual en pacientes frágiles después de un infarto agudo de miocardio	38.300,00 €	19.380,00 €	5.445,00 €	11.465,00 €
	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/01396	Immunobiología de la aloreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos asociado al uso de ciclofosfamida post-trasplante	116.765,00 €	48.400,00 €	36.905,00 €	31.460,00 €
	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/01408	Efectos de la inhibición de la desacetilación de las histonas en el remodelado post-infarto del sustrato arritmogénico	93.170,00 €	42.350,00 €	31.480,00 €	19.380,00 €
	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/01617	Papel de la heterogeneidad tumoral y la reprogramación intrínseca de la célula tumoral en la resistencia a anticuerpos anti-HER2 en cáncer de mama HER2 positivo	182.407,50 €	72.902,50 €	54.450,00 €	55.055,00 €
	FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA	G668880080	PI15/02180	Enfermedad mínima residual en cánceres colorrectales de alto riesgo resecados. Valor de las biopsias líquidas en el seguimiento y análisis de la heterogeneidad tumoral.	80.465,00 €	42.350,00 €	18.785,00 €	19.380,00 €

## **ANEXO II. HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE**

HOJA INFORMATIVA AL PACIENTE. Versión 2. Fecha 18/1/2016

*“Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante”*

### **HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE**

Versión 2. Fecha 18/1/2016

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** *“Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante”*

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Carlos Solano Vercet, Servicio de Hematología (carlos.solano@uv.es)

**CENTRO:** Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### **1. INTRODUCCIÓN**

Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, en el que se le invita a participar porque se le va a someter a un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico.

Nuestra intención es tan solo que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio.

Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

#### **2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### **3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO**

Los trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos tienen como finalidad la curación de diversas enfermedades de la sangre, mediante la sustitución de la médula ósea enferma por otra de un donante sano. Para que la médula ósea nueva y las células que produce se adapten bien al organismo, se requiere el mayor grado de compatibilidad posible entre donante y receptor.

Por ello, el donante óptimo será un familiar (hermano) compatible (la probabilidad estadística de que sea idéntico es de alrededor del 25% por cada hermano). Para aquellos pacientes que no disponen de un donante familiar compatible existen 3 alternativas:

1. Donante no familiar compatible de médula ósea de los registros internacionales;
2. Donante familiar haploidéntico (parcialmente compatible) de médula ósea;
3. Sangre de cordón umbilical de donante no familiar.

Clásicamente se ha utilizado a donantes voluntarios sanos no familiares de médula ósea de los registros internacionales con los que se dispone de una amplia experiencia. Sin embargo, muchos pacientes no dispondrán de un donante suficientemente compatible. Además el proceso de búsqueda y obtención de células de estos donantes puede demorarse varios meses. Por tanto, en caso de no disponer de este tipo de donantes o requerir un trasplante urgente, el trasplante de donante haploidéntico es una buena alternativa que ha aparecido y se ha refinado en los últimos años. En la actualidad existen diferentes métodos (cuatro son los más extendidos) para seleccionar el mejor donante para trasplante haploidéntico en función de la posibilidad de inducir una reacción inmune (tipo vacuna) frente a las células tumorales que causan la enfermedad neoplásica que padece. Sin embargo, se desconoce cuál de ellos es el mejor para que se produzca la curación de la enfermedad con las menores complicaciones posibles.

El estudio en el que le invitamos a participar pretende comparar estas cuatro modalidades de selección de donante en el trasplante haploidéntico que se le va a realizar al no disponer de un donante familiar o no familiar HLA idéntico. Para ello se utilizarán las técnicas habituales para dichos procedimientos que están ya bien implantadas en las unidades especializadas en trasplante. El objetivo de este protocolo es de carácter científico para ir mejorando de manera continuada los resultados obtenidos. A todos los pacientes se les trasplantará utilizando el donante seleccionado por el método que está en uso en cada Centro y al finalizar el estudio se compararán los resultados en función del método utilizado para seleccionar el donante. De esta forma se pretende mejorar progresivamente en el conocimiento de todos los factores que influyen en el éxito de estos procedimientos utilizados.

### **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO DE TRASPLANTE**

La fase inicial, conocida como acondicionamiento, consiste en la administración de dos o tres fármacos capaces de destruir las células causantes de la enfermedad. El acondicionamiento no distingue entre células enfermas y sanas, destruyendo células de la médula ósea imprescindibles para mantener la producción de células de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y

plaquetas). Para rescatar y producir un tejido medular nuevo y que produzca células sanguíneas es necesario infundir las células madre (progenitores hematopoyéticos) de un donante sano. Siempre que sea posible este será un hermano voluntario sano compatible (la probabilidad estadística es de alrededor del 25% por cada hermano). Si no se dispone de un familiar compatible se puede buscar un donante no familiar compatible en los registros internacionales. Si no se dispone de este último o el tiempo hasta su obtención es demasiado largo, se podrá emplear un donante familiar haploidéntico (compatible solo en aproximadamente el 50%) que puede ser un hermano, pero también padre/madre, hijos o primos. Las células madre son trasplantadas al paciente a través de un catéter central (tubo de material plástico introducido en una vena) colocado antes o justo después del ingreso del paciente para someterse al procedimiento descrito.

El procedimiento de obtención de las células madre del donante consiste en administrar un fármaco (G-CSF) por vía subcutánea durante 4 días para conseguir una estimulación de la médula ósea y salida de las células madre de la médula ósea a la sangre. Después se extraen de la sangre mediante un procedimiento denominado "aféresis": la sangre del donante entra en una máquina que extrae las células madre y devuelve bombea la sangre de vuelta al donante.

Tras el trasplante son necesarias entre dos y cuatro semanas para que las células madre aniden en la médula ósea y fabriquen suficientes células de la sangre para repoblar todo el organismo. Este es el motivo por el que usted deberá estar ingresado en la sala de hematología clínica, hasta evidenciarse en las analíticas diarias una recuperación de las cifras de glóbulos blancos necesaria para evitar el riesgo de infecciones. Esto hace que el régimen de visitas esté restringido según las normas que le facilitará el grupo de enfermería del servicio.

#### **4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.**

Los riesgos y beneficios derivados de participar en el estudio son los que derivan del procedimiento del trasplante en sí y no existe ningún riesgo añadido por participar en el estudio. La participación en el estudio no ofrece ningún beneficio añadido al del propio procedimiento. Su donante será seleccionado de entre sus familiares haploidénticos, siguiendo las prácticas y procedimientos habituales en nuestro Centro.

Los riesgos más habituales a los que está expuesto durante el procedimiento de trasplante se detallan a continuación:

- Infecciones y hemorragias por falta de glóbulos blancos y de plaquetas durante las 2-4 semanas antes mencionadas. Los antibióticos, y la posibilidad de realizar soporte transfusional (transfusión de plaquetas), hacen que estas complicaciones suelen ser fácilmente controlables.

- Cansancio por la destrucción de glóbulos rojos, siendo necesaria la transfusión de varios concentrados de hematíes durante el ingreso, dependiendo de las necesidades físicas de cada paciente.
- Toxicidad de la quimioterapia. Este tratamiento origina la caída transitoria del cabello, náuseas, vómitos, diarrea y úlceras en la boca de intensidad variable (conocido como mucositis) en gran parte de los pacientes. Es excepcional que se produzca una toxicidad grave que afecte a otros órganos vitales (hígado, pulmón, corazón, etc.).
- Años después del trasplante pueden aparecer cataratas y alteraciones hormonales (especialmente en niños y adolescentes). Otro de los efectos secundarios a tener en cuenta es la esterilidad, por lo general irreversible.
- Enfermedad del injerto contra el receptor. Puede aparecer a las 2-3 semanas (forma aguda) del trasplante o al cabo de meses (forma crónica), aunque se realice una profilaxis adecuada con fármacos inmunosupresores. La aparición de enfermedad injerto contra receptor requiere tratamiento intensivo, a veces durante un largo periodo de tiempo. Si se logra su control, la complicación habrá sido beneficiosa ya que ayuda a controlar la enfermedad. Si no se controla, supondrá un grave riesgo para el paciente al favorecer el desarrollo de infecciones graves por hongos o virus.
- Recidiva de la enfermedad de base. Aunque el trasplante ofrezca las máximas posibilidades de erradicar la enfermedad, en ocasiones esta puede reaparecer al cabo de cierto tiempo.

Debe usted saber que el equipo de médicos, enfermeras y el personal auxiliar de los diferentes que participan en este protocolo tiene amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de todas las complicaciones que puedan surgir tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos tanto de medula ósea como de sangre periférica, secundarios a la administración de quimioterapia, a la situación de inmunosupresión, así como a todos los posibles efectos derivados de la utilización de fármacos en la unidad de trasplante.

Sin embargo, incluso en los centros con gran experiencia, existe un riesgo real de fallecer como consecuencia de una complicación del trasplante. El riesgo real depende de varios factores relacionados con el paciente, el donante y el tipo de trasplante, este riesgo es inferior al beneficio esperado con el trasplante, por lo que su realización, en su caso, está del todo indicada.

## 5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

- a) Abstención terapéutica, dejando la enfermedad a su evolución natural.
- b) Quimioterapia sin trasplante: administración de algunos ciclos más de quimioterapia para intentar alcanzar una máxima remisión de la enfermedad.

- c) Trasplante auto génico de progenitores hematopoyéticos: opción terapéutica alternativa en algunas enfermedades. Dicho procedimiento, si bien comporta un menor riesgo que el trasplante alogénico, ofrece menos posibilidades de curación de la enfermedad y muchos casos no se ofrece como posibilidad por no aportar beneficio alguno en experiencia propia y de otros Centros.
- d) Trasplante alogénico de médula ósea de donante no emparentado (TMO-DNE). Este procedimiento ha sido el empleado clásicamente y se tiene mucha experiencia. El trasplante de sangre de cordón umbilical y el trasplante haploidéntica parecen ofrecer unos resultados a largo plazo similares a los del TMO-DNE, y aumentan las posibilidades de encontrar donantes óptimos y en un periodo de tiempo más corto.

## **6. SEGURO**

No existe póliza de seguros ya que este estudio no es un ensayo clínico y se utilizan prácticas y procedimientos habituales en nuestro Centro.

## **7. NÚMERO DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. Carlos Solano en el número de teléfono 961 973838 o mediante Fax 961 973839.

## **8. CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado, y, eventualmente a las autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país. El responsable del Registro de los datos será el investigador responsable del estudio, Dr. Carlos Solano.

## **7. COMPENSACIÓN ECONÓMICA**

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto, ni tampoco recibirá compensación económica alguna.

### ANEXO III. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO. PACIENTE TRATADO CON TRASPLANTE HEMATOPOYETICO HAPLOIDÉNTICO

Versión 2. Fecha 18/1/2016

**Título:** Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante.

**Código:** AloNK-Haplo

Yo,.....he sido informado por el Dr.....investigador o colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que :

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- o Cuando quiera.
- o Sin tener que dar explicaciones.
- o Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica.

Sí                      No

Autorizo la utilización de datos clínicos y mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación.

Sí                      No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha:



## ANEXO IV. HOJA INFORMATIVA AL DONANTE

HOJA INFORMATIVA AL DONANTE. Versión 2. Fecha 18/1/2016  
*“Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante”*

### HOJA INFORMATIVA AL DONANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Versión 2. Fecha 18/1/2016

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** *“Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante”*

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Carlos Solano Vercet, Servicio de Hematología (carlos.solano@uv.es)

**CENTRO:** Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### 1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, en el que se le invita a participar porque va a ser donante de células madre hematopoyéticas para trasplante en su familiar. Nuestra intención es tan solo que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio. Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

#### 2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento, si lo hubiere, ni en el del paciente.

#### 3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Los trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos tienen como finalidad la curación de diversas enfermedades de la sangre mediante la

sustitución de la médula ósea enferma por otra de un donante sano. Para que la médula ósea nueva y las células que produce se adapten bien al organismo, se requiere el mayor grado de compatibilidad posible entre donante y receptor. Por ello, el donante óptimo será un familiar (hermano) compatible (la probabilidad estadística de que sea idéntico es de alrededor del 25% por cada hermano). Para aquellos pacientes que no disponen de un donante familiar compatible existen 3 alternativas:

1. Donante no familiar compatible de médula ósea de los registros internacionales;
2. Donante familiar haploidéntico (parcialmente compatible) de médula ósea;
3. Sangre de cordón umbilical de donante no familiar.

Clásicamente se ha utilizado a donantes voluntarios sanos no familiares de médula ósea de los registros internacionales con los que se dispone de una amplia experiencia. Sin embargo, muchos pacientes no dispondrán de un donante suficientemente compatible. Además, el proceso de búsqueda y obtención de células de estos donantes puede demorarse varios meses. Por tanto, en caso de no disponer de este tipo de donantes o requerir un trasplante urgente, el trasplante de donante haploidéntico es una buena alternativa que ha aparecido y se ha refinado en los últimos años. En la actualidad existen diferentes métodos (cuatro son los más extendidos) para seleccionar el mejor donante para trasplante haploidéntico en función de la posibilidad de inducir una reacción inmune (tipo vacuna) frente a las células tumorales que causan la enfermedad neoplásica que padece el paciente. Sin embargo, se desconoce cuál de ellos es el mejor para que se produzca la curación de la enfermedad con las menores complicaciones posibles.

El estudio en el que le invitamos a participar pretende comparar estas cuatro modalidades de selección de donante en el trasplante haploidéntico en el que va a participar como donante, al no disponer su pariente enfermo de un donante familiar o no familiar HLA idéntico. Para ello se utilizarán las técnicas habituales para dichos procedimientos que están ya bien implantadas en las unidades especializadas en trasplante. El objetivo de este protocolo es de carácter científico para ir mejorando de manera continuada los resultados obtenidos. A todos los pacientes se les trasplantará utilizando el donante seleccionado por el método que está en uso en cada Centro y al finalizar el estudio se compararán los resultados en función del método utilizado para seleccionar el donante. De esta forma se pretende mejorar progresivamente en el conocimiento de todos los factores que influyen en el éxito de estos procedimientos utilizados.

## **DESCRIPCIÓN DE LA DONACIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS**

La fase inicial del trasplante, conocida como acondicionamiento, consiste en la administración al paciente de dos o tres fármacos capaces de

destruir las células causantes de la enfermedad. El acondicionamiento no distingue entre células enfermas y sanas, destruyendo células de la médula ósea del paciente imprescindibles para mantener la producción de células de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas). Para rescatar y producir un tejido medular nuevo y que produzca células sanguíneas es necesario infundir las células madre (progenitores hematopoyéticos) de un donante sano. Siempre que sea posible este será un familiar voluntario sano compatible, más frecuentemente un hermano (la probabilidad estadística es de alrededor del 25% por cada hermano). Si no se dispone de un familiar compatible se puede buscar un donante no familiar compatible en los registros internacionales. Si no se dispone de este último o el tiempo hasta su obtención es demasiado largo, se podrá emplear un donante familiar haploidéntico (compatible solo en aproximadamente el 50%) que puede ser un hermano, pero también padre/madre, hijos o primos. Las células madre del donante son trasplantadas al paciente a través de un catéter central (tubo de material plástico introducido en una vena) colocado antes o justo después del ingreso del paciente para someterse al procedimiento descrito.

Tras el trasplante son necesarias entre dos y cuatro semanas para que las células madre del donante aniden en la médula ósea y fabriquen suficientes células de la sangre para repoblar todo el organismo del paciente. Este es el motivo por el que usted deberá estar ingresado en la sala de hematología clínica, hasta evidenciarse en las analíticas diarias una recuperación de las cifras de glóbulos blancos necesaria para evitar el riesgo de infecciones. Esto hace que el régimen de visitas esté restringido según las normas que le facilitará el grupo de enfermería del servicio.

## **Proceso de obtención de células progenitoras hematopoyéticas:**

### **Finalidad de la aféresis**

La aféresis es un proceso empleado para extraer un componente sanguíneo destinado a la transfusión o para el tratamiento de algunas enfermedades que precisan la eliminación de un componente patológico de la sangre.

### **Descripción del proceso**

El procedimiento de obtención de las células madre hematopoyéticas consiste en administrar un fármaco (G-CSF) por vía subcutánea durante 4 días para conseguir una estimulación de la médula ósea y salida de las células madre de la médula ósea a la sangre. Después se extraen de la sangre mediante un procedimiento denominado "aféresis".

El procedimiento de aféresis consiste en conectar por vía venosa (1-2 accesos) al donante a una máquina separadora de células, mediante un equipo

de bolsas y tubos de recolección estériles. La sangre llega al separador celular, donde se procesa y se selecciona el producto a recolectar, el resto de la sangre es devuelta al paciente o donante. La aféresis para obtener células madre hematopoyéticas suele durar unas 2 horas.

Los criterios de selección del donante son los mismos establecidos para la donación de sangre.

Este procedimiento se realiza bajo la supervisión de personal médico y de enfermería con experiencia en este tipo de donación.

Periódicamente se realizan una serie de controles de la donación como pulso, tensión, estado general del donante o paciente.

### **Efectos secundarios**

La administración de G-CSF puede provocar un síndrome gripal, es decir, dolores leves musculares y cefalea que remite al finalizar su administración y, si fuera necesario, mejora con analgésicos tipo paracetamol.

Durante las aféresis los efectos secundarios más frecuentes son los calambres musculares, que se solucionan con cierta facilidad suministrando calcio.

Otros efectos secundarios de muy baja frecuencia son: hipotensión debido a la circulación extracorpórea, malestar general o síncope.

## **4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.**

Los riesgos y beneficios derivados de participar en el estudio son los que derivan del procedimiento de aféresis en sí, que es un procedimiento estándar y no existe ningún riesgo añadido por participar en el estudio. La participación en el estudio no ofrece ningún beneficio añadido al del propio procedimiento.

Los riesgos más habituales a los que está expuesto durante el procedimiento de aféresis son los ya detallados en el apartado anterior. En cuanto a su participación en el estudio consiste únicamente en autorizar la extracción y almacenamiento de células, suero o plasma para su posterior procesado y análisis en paralelo a los de su familiar.

Debe usted saber que el equipo de médicos, enfermeras y el personal auxiliar de los diferentes centros que participan en este protocolo tiene amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de todas las complicaciones que puedan surgir durante el proceso de donación de progenitores hematopoyéticos tanto de médula ósea como de sangre periférica.

## **5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS**

- a) No donación de progenitores hematopoyéticos.
- b) Donación de progenitores hematopoyéticos de médula ósea: dicho procedimiento comporta los riesgos de someterse a anestesia general o epidural

con objeto de obtener aproximadamente 1 litro de médula ósea a partir de punciones en los huesos iliacos (caderas) durante unos 90 minutos. Era el método utilizado originalmente y se sigue empleando en algunos Centros, sin embargo, cada vez se utiliza menos (10-15%) debido a que el uso de células madre hematopoyéticas obtenidas mediante aféresis tiene ventajas clínicas para el paciente, sobre todo una más rápida recuperación hematológica.

## **6. SEGURO**

No existe póliza de seguros ya que este estudio no es un ensayo clínico y se utilizan prácticas y procedimientos habituales en nuestro Centro.

## **7. NÚMERO DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. Carlos Solano en el número de teléfono 961 973838 o mediante Fax 961 973839

## **8. CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado, y, eventualmente a las autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país. El responsable del Registro de los datos será el investigador responsable del estudio, Dr. Carlos Solano.

## **9. COMPENSACIÓN ECONÓMICA**

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto, ni tampoco recibirá compensación económica alguna.

## ANEXO V. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL DONANTE

Versión 2. Fecha 18/1/2016

**Título:** Inmunobiología de la alorreactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida postrasplante.

**Código:** AloNK-Haplo

Yo,.....he sido informado por el  
Dr.....investigador o colaborador del  
proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que :

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos, si los precisase, ni en los del paciente.

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica que tengan por objeto el estudio de la enfermedad que padece mi familiar enfermo y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica.

Sí                      No

Autorizo la utilización de datos clínicos y mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación.

Sí                      No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del donante:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha:

## ANEXO VI. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

### INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

Dña. Cristina Gomis Gozalbo, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

#### CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 25 de febrero de 2016, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados con la Modificación de la Hoja de Información al Paciente del proyecto de investigación que lleva por título:

***Immunobiología de la alo-reactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidenticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida post-trasplante.***

Mismo que será llevado a cabo en el Servicio de Hematología y cuyo investigador principal es el Dr. Carlos Solano Vercet, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas de la Fundación BBVA.

Valencia, 25 de febrero de 2016.

Fdo. : Dra. Dña. Cristina Gomis Gozalbo  
Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica

## ANEXO VII. INFORME DEL COMITÉ CIENTÍFICO INTERNO DE LA FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA



En Valencia, a 22 de mayo de 2015

D. Josep Redón i Más, Presidente del Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

### CERTIFICA

Que el proyecto con título "Inmunobiología de la alo-reactividad NK en el trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidenticos (Haplo-TPH) asociado al uso de ciclofosfamida post-trasplante", presentado por Carlos Solano Vercet perteneciente a esta institución, ha sido evaluado por este Comité en su reunión del día 21 de mayo de 2015, encontrándolo conforme con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

Y para que conste, se firma en la ciudad y fecha arriba indicadas

A handwritten signature in black ink, appearing to be "JRM.", is written over a light blue rectangular background.

Fdo.: Dr. Josep Redón i Más  
Presidente del Comité

F-EG-CCI-9 Certificado conformidad



**ANEXO VIII. HOJA IDENTIFICADORA DEL PACIENTE Y SU DONANTE**

**ESTUDIO FIS AloNK-Haplo P115/01396:**

**HOJA IDENTIFICADORA DEL PACIENTE Y SU DONANTE**

**CORRESPONDIENTE**

**PACIENTE:**

Iniciales (del nombre y apellidos):

Diagnóstico:

Tipo de acondicionamiento (mielo/no mieloablativo):

Identificación:

Código UPN:

Fecha TPH alogénico haploidéntico:

Criterio de selección empleado:

Profilaxis EICR:

EICR aguda (si/no):                      Fecha:

EICR crónica (si/no):                      Fecha

Momento de obtención de muestra actual:

Fecha actual:

.....

**DONANTE VINCULADO AL PACIENTE ARRIBA EXPUESTO:**

Iniciales (del nombre y apellidos):

Relación de parentesco:

Sexo: Masculino / Femenino

Edad:

Fdo. Responsable envió:

## ANEXO IX. TÉCNICAS DE TIPAJE DE BIOLOGÍA MOLECULAR



### EXTRACCIÓN DE ADN

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-16				
Edición	Fecha emisión			
03	04/06/2021	Fdo: FE HLA	Fdo: Jefe Sección	Fdo: Jefe de Calidad

#### **OBJETIVO:**

Aislar ADN a partir de muestras de sangre periférica o de cualquier suspensión de células nucleadas (incluido concentrado de capa leucoplaquetar, suspensión procedente de hisopos de raspado bucal, etc.).

**DIRIGIDO A:** Personal del Laboratorio de Histocompatibilidad (HLA)

#### **MATERIALES Y EQUIPOS:**

9. Extractor de ADN "Kit completo de extracción de ADN
10. Microcentrífuga para tubos eppendorf
11. Micropipetas de volumen ajustable
12. Puntas "RNase free" con filtro
13. Tubos Eppendorf de 1.5 y 0.5 ml
14. Tubos con hisopos
15. Incubador de temperatura
16. Guantes desechables

#### **DESARROLLO:**

Proceso realizado en el laboratorio de pre-amplificación. La obtención de muestras, si es en el CTCV, se realizará en el laboratorio de recepción y registro de muestras.

Ordenar los tubos de muestra originales y registrarlos en el orden en que se vayan a procesar en el "Libro de Registro de Extracciones de ADN", anotando la fecha del proceso.

Según el protocolo utilizado proceder de acuerdo con los manuales de uso:

Manual técnico Maxwell 16 Blood DNA purification System.

Manual del EZ1 AdvancedXL\_1117\_HB

Manual del EZ1\_DSP\_DNA\_Blood\_Kit\_0215\_ES

## Preparación de una carrera de extracción con EZ1 DSP DNA Blood Kit

Para realizar el mantenimiento preventivo seguir el “Manual del Mantenimiento del EZ1 por parte del usuario”

En el caso de que la muestra biológica de partida proceda de raspado bucal obtenido mediante una torunda de algodón, proceder de la siguiente manera:



Extraer el hisopo sin tocar el extremo de algodón. Si se manipula el extremo del hisopo puede quedar material genético ajeno a la muestra.



Frotar vigorosamente la parte interna de los carrillos y la cara externa de las encías durante unos seg. Se tomarán dos muestras por persona. Guardar los hisopos cada uno en su tubo correspondiente perfectamente identificado (con solución conservante).

Vortear los tubos durante 1 o 2 min. Desechar los hisopos y utilizar un volumen de 270 ul de suspensión para procesar en el cartucho del instrumento como si se tratase de una alícuota de sangre total o buffy coat, según se indica en el documento externo “Manual técnico Maxwell 16 Blood DNA purification System”.

Independientemente del proceso realizado, medir el ADN, si procede, según PR-HLA-17.

Si el ADN no se usa inmediatamente después de la extracción, deberá congelarse a -20°C para proteger la integridad de la muestra.

### **-Criterios de aceptación:**

Si una vez que el proceso ha sido satisfactorio se procederá a medir el DNA aceptando todos los valores de la pureza de ADN indicados en el PR-HLA 17.

### **-Criterios de rechazo:**

Si el valor de la pureza de ADN (260/280) es inferior a 1,5, puede ser recomendable repetir el proceso de extracción de ADN a partir de la muestra original.

## **DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

Documento externo facilitados por el Proveedor:

Manual del EZ1 AdvancedXL\_1117\_HB\_ES (1)

Manual del EZ1\_DSP\_DNA\_Blood\_Kit\_0215\_ES

Preparación de una carrera de extracción con EZ1 DSP DNA Blood Kit

Manual de Mantenimiento del EZ1 por parte del usuario

Manual técnico Maxwell 16 Blood DNA purification System.

PR-HLA-01: Recepción de muestras en el laboratorio de HLA.

PR-HLA-17: Medida de la concentración de ADN.

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-17		Fdo: Facultativo	Fdo: Responsable	Fdo: Jefe de Calidad
Edición	Fecha emisión			
01	18/01/2019			

**1.OBJETIVO**

Determinar por espectrofotometría la concentración de ADN y su grado de pureza en una muestra obtenida mediante cualquier protocolo de extracción de ADN.

**2. MATERIALES Y EQUIPOS**

- 1) Espectrofotómetro “BioPhotometer eppendorf”
- 2) Cubetas desechables de medición de ADN (si es posible, “UVette de 8.5mm de eppendorf)
- 3) Micropipetas de volumen ajustable y puntas

**3. MÉTODO****3.1. Personal**

Personal Técnico del Laboratorio de Histocompatibilidad (HLA)

**3.2. Desarrollo**

1. Encender el espectrofotómetro.
2. Si no aparece de forma automática en la pantalla, seleccionar el método dsDNA presionando la tecla correspondiente.
3. Hacer primero el blanco. Para ello, rellenar la cubeta del espectrofotómetro con agua destilada y colocarla en el biofotómetro; presionar la tecla “Blank” y esperar a que en la pantalla se confirme el blanco.
4. Medir el ADN de la muestra problema. Para ello, sacar la cubeta, vaciarla y añadir unos 50-100 µl de la muestra de ADN a medir. Colocarla en el biofotómetro y presionar la tecla “Sample”. Si procede, anotar la lectura de concentración (µg/mL) y pureza (260/280) en alguna de las planillas de tipaje de esa muestra. Si se precisa

recuperar la muestra medida, transferirla a su tubo original y desechar la cubeta.

5. Si se requiere medir otra muestra, proceder de la misma manera pero utilizando una nueva cubeta.
6. En el caso de que se presuponga una alta concentración de ADN en la muestra a medir, hacer una dilución de la muestra problema. Preparar un volumen final a medir de unos 100  $\mu\text{l}$  (por ejemplo, 10  $\mu\text{l}$  de muestra en 100  $\mu\text{l}$  de diluyente -agua destilada-). Colocar la cubeta en el espectrofotómetro y presionar la tecla "Dilution". Teclear primero el volumen de muestra, presionar "Enter", introducir el volumen de diluyente y presionar "Enter" de nuevo. A continuación presionar la tecla "Sample" y leer la concentración en la pantalla.

#### **Verificación del biofotómetro:**

Para realizar la verificación del biofotómetro, se medirá una muestra de ADN de concentración conocida procediendo de la manera descrita anteriormente. Se deben anotar todos los parámetros de la pantalla ( $\mu\text{g/mL}$ , 26/280, 260/230,  $A_{230}$ ,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{320}$ ) en la ficha de verificación del aparato.

#### **4. RESULTADOS**

El valor en  $\mu\text{g/ml}$  que aparece en la pantalla corresponde a la concentración real de ADN en la muestra, tanto si estaha sido diluida para su medición (el aparato corrige automáticamente la lectura por el factor de dilución correspondiente), como si no.

Si el valor de la pureza de ADN (260/280) es inferior a 1.5, puede ser recomendable repetir el proceso de extracción de ADN a partir de la muestra original.

#### **5. DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA**

PR-HLA-16: Extracción de ADN.

**TIPAJE HLA POR CITOMETRÍA DE  
FLUJO (LUMINEX)**

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-18				
Edición	Fecha emisión			
02	04/06/2021	Fdo: Facultativo	Fdo: Jefe Sección	Fdo: Jefe de Calidad

**OBJETIVO:**

Realizar el tipaje HLA de Clase I o de Clase II mediante PCR-SSO inversa siguiendo el protocolo correspondiente.

**MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

1. Kit PCR-SSO en función del tipaje que vaya a realizarse
2. Taq DNA polimerasa, 5 u/μl
3. Estreptavidina conjugada con ficoeritrina
4. H<sub>2</sub>O destilada
5. Etanol 70%
6. Lejía
7. Fluido del sistema
8. Micropipetas de volumen ajustable
9. Puntas "RNase free" con filtro
10. Material fungible (tubos, cubiertas) adaptable a los termocicladores
11. Tubos eppendorf
12. Gradilla para termociclador
13. Guantes desechables
14. Termocicladores
15. Citómetro y accesorios del sistema.
16. Sonicador

**DIRIGIDO A:**

Personal del laboratorio de Histocompatibilidad (HLA)

**DESARROLLO:**

Anotar en el libro de trabajo del laboratorio las muestras que van a tiparse perfectamente identificadas y el tipaje que va a realizarse, según el nº de

orden en que se han colocado en la gradilla de amplificación. Indicar la fecha.

### **1. Puesta en marcha del Citómetro:**

Para encender el Citómetro, seguid el orden siguiente:

1º Plataforma.

2º Equipo.

3º Ordenador.

Nota: El sistema de fluidos debe estar siempre conectado. Comprobad que haya fluidos de sistema en la garrafa y el nivel de la de desechos.

#### **1.1 Equipo Luminex LABScan™**

Tras conectar el ordenador aparece en pantalla el menú de la pestaña Home, del cual hay que ejecutar el Daily Startup, que consta de cuatro botones:

- **Warmup:** Calentamiento del láser. El calentamiento comienza automáticamente al encender el equipo (aunque no se ejecute este comando) y tarda 30 minutos. Una vez caliente, se mantiene hasta 4 horas con el equipo inactivo (y todo el tiempo necesario mientras el equipo está en funcionamiento)
- **Prime:** Cebado de los conductos del equipo (para eliminar el aire) con líquido del sistema que el equipo toma directamente de la garrafa, por lo que no es necesario disponer ningún líquido en el reservorio
- **Wash:** Lavado. Realizad siempre con agua destilada. El equipo toma el agua del reservorio o de un pocillo de la placa de lectura (según se haya programado)

Realizad 3 lavados con líquido del sistema. Para ello...

Pulsad el botón Wash.

Picad EJECT para sacar el soporte y rellenad la cubeta con fluido del sistema. Cerrad y OK. Repetir 2 veces más el lavado pulsando Wash y luego OK.

- **Alcohol Flush:** Lavados con alcohol (etanol al 70%) utilizados para eliminar burbujas de aire. El equipo toma el alcohol del reservorio (en un pocillo de la placa no hay suficiente volumen).

NOTA: Si tardamos más de dos horas en trabajar el láser se apagará, por lo que habrá que pulsar Warmup de nuevo y esperar 30 minutos, a que caliente de nuevo el láser.

#### **1.2 Equipo Luminex 200**

Tras conectar el ordenador y entrar en el programa Luminex xPONENT aparece en la pantalla el menú de la pestaña Home, del cual hay que ejecutar el System Initialization en la sección Daily Activities. En la pestaña



Auto Maint que se abrirá ejecutad la Performance Verification. Añadid los reactivos indicados en el Panel de Reactivos en el reservorio. Ejecutad Run.

## 2. Pre-amplificación:

Proceded a la extracción del ADN, según descrito en el PR-HLA-16 y a la medida de la concentración del mismo según el PR-HLA-17.

En placa de PCR, marcad con rotulador la situación de las muestras que se van a tipar, separando cada locus entre sí.

Dependiendo de la concentración de ADN dispensad el siguiente volumen en su pocillo correspondiente:

20-30 ng/μL -> 3 μL de ADN

50-200 ng/μL -> 2 μL de ADN

15-25 ng/uL-> 1 μL de ADN

Diluid en agua destilada si fuese necesario.

## 3. Preparación mezcla D-Mix, Primers específicos para cada locus y Taq:

Operar según se indica en los documentos externos. Dependiendo de la técnica usada y los reactivos se consultarán los siguientes manuales:

1) Prospecto LABType<sup>®</sup> SSO Typing Tests", que se suministra como *packet insert* con los reactivos del Kit LABType<sup>®</sup> SSO.

2) Manual del usuario Luminex 200

3) Protocolo corto XPONENT

4) Protocolo corto TIPAJE HLA-SSO (guardias)

5) Manual MATCH IT DNA.

Lacrad la placa con papel adhesivo y colocar la tapa de goma para asegurar que no se despegue en el termociclador.

Poned en el Termociclador con el programa correspondiente a esta técnica.

## 4. Post- amplificación:

### 4.1 Equipo Luminex LABScan™:

En una placa de PCR marcar nuevamente la plantilla de trabajo.

## DESNATURALIZACIÓN/ NEUTRALIZACIÓN:

Con la pipeta de 8 canales dispensad en cada pocillo 2,5 μl de Tampón de Desnaturalización.

A continuación, se dispensan 5μl del producto amplificado mezclando bien con la pipeta. (Tomará un color anaranjado suave).

Incubad a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Dispensad 5 μ de Tampón Neutralizante, agitando suavemente con la pipeta y tiene que virar de color anaranjado a amarillo.

(Si algún pocillo no vira de color puede añadirse 1 ó 2 μl más de tampón neutralizante, hasta que vire a color amarillo)

Poned en gradilla de frío mientras se prepara la Hibridación.  
Poned el termociclador en el programa incuba de 60°.

### **HIBRIDACIÓN:**

#### **Preparación mezcla hibridación:**

Multiplicad las siguientes cantidades por el número de muestras a tipar mas uno:

17 µl de Tampón de Hibridación.

2 µl de Bead's específicos (agitar muy bien en el vortex antes de coger la cantidad deseada).

Dispensad **19 µl** de la mezcla por pocillo.

Poned a termociclar en el programa incuba durante 15 minutos.

Lavad 3 veces con 70 ml. de Wash Buffer. Programa 7 u 8 de la centrifuga eppendorf. Decantad secando con un paño o papel absorbente.

### **SAPE:**

#### **Preparación mezcla sape:**

Multiplicad las siguientes cantidades por el número total de muestras y añadir 2:

**24,8 µl** de Tampón Sape

**0,25 µl** de Espretavidina (fluorocromo).

Dispensad **24,5 µl** de la mezcla por pocillo.

Poned a termociclar en en el programa incuba a 60° durante 5 minutos.

Lavad una vez con 70 ml. de Líquido del sistema, decantar, secar, y añadir 70 ml. de líquido del sistema para su lectura.

Pasad el contenido a otra placa con fondo en U y leer en el Luminex.

## **4.2 Equipo Luminex 200:**

### **HIBRIDACIÓN:**

Asegurarse de que los componentes del tampón de hibridación de la mezcla de sondas LIFECODES estén solubilizados y las microesferas totalmente suspendidas.

Calentad la mezcla de sondas en un bloque calefactor a 55-60 °C durante 5-10 minutos.

Tratad durante 1 minuto la mezcla de sondas con ultrasonidos y agítad en vórtex unos 15 segundos para suspender por completo las microesferas. En caso de no disponer de sonicador, agítad en vórtex durante 2 minutos.

En una nueva placa, añadid 2,5 µL de ADN amplificado junto a 7,5 µL de la mezcla adecuada de sondas.

Se debe de agitar cada mezcla de sondas después de dispensar cada fila de pocillos.

Sellad la placa y colocad la estera de compresión de silicona.  
Hibridad con el programa SSO-HIB-CORTO (20 min).

### **PREPARACIÓN DS y SAPE:**

Multiplicad las siguientes cantidades por el número de muestras a tipar más uno:

100 µL de Solución diluyente (DS).

0,4 µL de PE-estreptavidina (SAPE).

Mantener en oscuridad la mezcla.

Después de los 20 min de hibridación, sin apagar el termociclador y manteniendo la placa en él, diluid cada muestra con 100 µL de la mezcla DS+SAPE antes de que transcurran 5 minutos.

Finalmente, leed en Luminex.

Nota: cada vez que llegue con el kit una nueva botella de solución de lavado, realizad un calentamiento a 45° C durante 5 minutos. Conservar a temperatura ambiente. No refrigerar ni congelar.

## **5. Mantenimientos rutinarios y preventivos del aparato:**

### **5.1 Equipo Luminex LABScan™**

Diariamente se realizará las tareas de mantenimiento consistentes en el programa llamado “Arranque” (antes de empezar a utilizar el citómetro) y al finalizar el trabajo del día se llevará a cabo el programa denominado “Parada”.

Verificar el LABScan™ con sus calibradores y controles siempre que ocurra alguna de las siguientes situaciones:

- a) haya  $\pm 3^{\circ}$  de diferencia respecto a la temperatura de calibración anterior, o
- b) se cambie el Fluido, o
- c) haya una reparación/instalación del citómetro.

En ausencia de cualquier problema, pasar los calibradores y controles una vez al mes.

Registrad el mantenimiento en el IM-HLA-18A.

### **5.2 Equipo Luminex 200**

Diariamente se realizarán las tareas de mantenimiento consistentes en el programa llamado “Arranque” (antes de empezar a utilizar el citómetro) y al finalizar el trabajo del día se llevará a cabo el programa denominado “Parada”.

Verificar el citómetro con sus calibradores y controles siempre que ocurra alguna de las siguientes situaciones:

- 1- Cada vez que el supervisor del sistema (botón RUNBATCH) muestre que se ha producido un incremento de temperatura de  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Cada vez que se emplee una nueva garrafa de fluido del sistema.

En ausencia de cualquier problema, pasar los calibradores y controles una vez al mes.

Registrar el mantenimiento en el IM-HLA-18A.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Adquisición de datos:**

#### **Equipo Luminex LABScan™**

-Entrad en Fusión (Usuario/contraseña) y seleccionar el análisis tipajes  
En la pantalla del **sumario**, picad "**EXPORT**", y lo guardamos en el **disco :O**  
(como documento xls)

-Entrad en Aplicaciones del Centro de Transfusión.

-Picad en **Pheno** (Usuario/contraseña)

-Entrad en **onlines**....Laboratorio...Reconversor de **onlines**.

Ubicación del fichero. Desplegad la pestaña junto al :C y seleccionar :F

-Se busca la sesión ((O:)------ HLA) y se pica....Abrid fichero...Cread fichero...OK.

-Haced lo mismo con todas las sesiones que nos interesan.

-Salid.

Los ficheros están disponibles para que la persona autorizada valide esos resultados, a través del Hematos.

#### **Equipo Luminex 200**

Se hace con el botón Batch Summary Report (último botón)

- Con el calendario escoger la fecha en la que se hizo el batch  
- Seleccionar el batch y pasar al cuadro de la derecha las muestras que se quieren informar. Para esto seleccionarlas en Samples y pasarlas a la derecha con la flecha (> pasa la muestra seleccionada y >> pasa todas las muestras).

- Seleccionar Batch Summary Report

- Con .... Seleccionar dónde se quiere guardar el archivo

- Hacer clic en el dibujo de la impresora para que se cree el archivo con los datos.

### **6.2 Análisis de resultados:**

#### **Equipo Luminex LABScan™**

Se realiza a través del programa FUSION.

### **Equipo Luminex 200**

Se realiza a través del programa MATCH IT DNA.

#### **6.3 Criterio de valoración:**

Ver el Documento Externo “Prospecto” de LabType SSO. Apartado resultados A, B y C”.

#### **6.4 Validación de los datos:**

Entrar en Hematos, ir a Laboratorio “**importación de resultados**”

De las opciones que salen, seleccionar “**Online HLA Citómetro Baja Resolución**”....después. **Importación de resultados.**

Salir...Anular...En este momento se están importando todos los resultados, si hubiera algún problema con alguna muestra nos lo dirá en pantalla.

Salir

#### **6.5 Comprobación de la transferencia:**

Tras realizar el online al HEMATOS se debe comprobar que los resultados se han transferido correctamente.

Entrar en el HEMATOS, apartado **Laboratorio...Introducción manual.**

Con la libreta de trabajo se comprueba que las muestras que han quedado pendientes y tenemos que repetir, están en blanco y no ha pasado ningún resultado a través del online. En caso contrario borrar resultados.

#### **6.6. Criterios de aceptación.**

Tras la adquisición de datos en el Luminex y asignación de un determinado tipaje HLA por el programa correspondiente, solo se aceptarán como válidos los resultados cuando el cómputo del nº total de bolas analizadas sea superior a 30. Al analizarlo en el software correspondiente, la intensidad de fluorescencia para las sondas de control positivo se encuentre entre 1000 y 4000, según el lote. No obstante, en algunos casos puede encontrarse el valor de intensidad de fluorescencia fuera de rango y no afectar al tipaje; en estos casos, el Facultativo dará las indicaciones oportunas para realizar las comprobaciones que estime necesarias.

Dado un resultado aceptado, se procederá a la emisión del informe de tipaje HLA de una muestra dada. En este informe siempre se hará constar la identificación del técnico que ha realizado el ensayo, con su firma y de la persona que ha revisado y confirmado este análisis (el facultativo).

#### **6.7. Criterios de rechazo.**

No se aceptará como válido un tipaje cuando el cómputo del nº total de bolas analizadas sea inferior a 30. También se invalidarán los resultados cuando la intensidad de fluorescencia para las sondas de control positivo se

encuentre fuera del rango entre 1000 y 4000 y no se detecten patrones de reacción asignables. En ambos casos, y siempre que no se produzca asignación de tipaje, se procederá a la repetición del ensayo en las condiciones recomendadas por el responsable.

Una vez el tipaje haya sido revisado y verificado por el Supervisor/Facultativo responsable, se introducirán los resultados en la base de datos Hematos. El Facultativo responsable con acceso autorizado al programa Hematos será el encargado de validar los resultados on line para que el informe de Histocompatibilidad se encuentre disponible en la red a los Centro Hospitalarios de la Generalitat Valenciana debidamente autorizados.

### **6.8. Equivalencia serológica**

Si es necesaria la conversión de los resultados obtenidos a equivalencia serológica se debe hacer según los siguientes parámetros:

Los fenotipos y genotipos deben expresarse según recomendaciones de *WHO Committee* según los siguientes ejemplos:

Nomenclatura DNA: HLA A\*02, \*30; B\*07, \*44; C\*07, \*16; DRB1\*01, \*04; DQB1\*05, \*03:01 Nomenclatura serológica: HLA- A2,30; B7,44; Cw7; DR1,4;DQ5,7.

### **DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

PR-HLA-16: Extracción ADN

PR-HLA-17: Medida de la concentración de ADN

#### **Documentos Externos:**

Prospecto del LabType SSO (*packet insert* con los reactivos del Kit LABType<sup>®</sup> SSO).

Manual del usuario del Luminex 200

Protocolo corto XPONENT

Protocolo corto TIPAJE HLA-SSO (guardias)

Manual "MATCH IT DNA"

Manual para la exportación de resultados MATCH IT-Hematos

**TIPAJE HLA POR PCR (PROTOCOLO  
Olerup SSP®)**

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-20				
Edición	Fecha emisión			
01	19/1/19	Fdo: Facultativo	Fdo: Jefe Sección	Fdo: Jefe de Calidad

### **1.OBJETIVO**

Realizar el tipaje HLA de Clase I o de Clase II, de alta o baja resolución, mediante amplificación con “primers” específicos liofilizados y prealiquotados en placa, siguiendo el protocolo “Olerup SSP™”.

### **2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

En el laboratorio de pre-amplificación (laboratorio PCR-1 del CTCV):

1. Placas “Olerup SSP™” en función del tipaje que vaya a realizarse
2. PCR Master Mix (without Taq) Olerup SSP™
3. Taq DNA polimerasa, 5 u/μl
4. H<sub>2</sub>O destilada
5. Puntas “RNase free” con filtro
6. Tubos eppendorf de 0.5 ml
7. Guantes desechables
8. Material fungible y accesorio propio del termociclador
9. Pipetas propias del laboratorio pre-PCR
10. Material fungible propio del laboratorio pre-PCR

En el laboratorio de amplificación-detección (laboratorio PCR-2):

17. Termociclador GeneAmp PCR System 9700
18. Equipo de electroforesis y documentación de geles
19. Pipetas propias del laboratorio post-PCR
20. Material fungible propio del laboratorio post-PCR

### **3. MÉTODO**

#### **3.1 Personal**

Personal del laboratorio de Histocompatibilidad (HLA).

### **3.2 Desarrollo**

En el laboratorio de pre-amplificación:

1. En una gradilla de termociclador, colocar tantas placas *Olerup SSP*™ como tipajes vayan a realizarse.
2. Preparar la mezcla de amplificación en un tubo eppendorf de 0.5 ml, siguiendo los volúmenes recomendados en la siguiente tabla:

<b>Olerup SSP</b>	<b>48 reacciones</b>	<b>24 reacciones</b>	<b>16 reacciones</b>	<b>8 reacciones</b>
<b>MMix <i>Olerup</i></b>	159 µl	84 µl	57 µl	30 µl
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	343 µl	180 µl	124 µl	64 µl
<b>Taq (5u/µl)</b>	2.6 µl	1.3 µl	1 µl	0.5 µl
<b>ADN</b>	20 µl	10 µl	7 µl	5 µl

Conviene tener en cuenta las siguientes consideraciones sobre las concentraciones de ADN y Taq polimerasa:

**Concentración de ADN diana:** El volumen de ADN especificado en la tabla ha sido validado para el extraído según el procedimiento descrito en el PR-HLA-16, pero puede variar si la muestra de ADN se ha obtenido por otro procedimiento (tal es el caso de muestras de ADN de origen externo); en ese caso, ajustar la concentración de ADN muestra (que vendrá especificada en el formulario de petición analítica) a aproximadamente 30 ng/µl (concentraciones superiores a 50 ng/µl incrementarán el riesgo de amplificación inespecífica). Por otra parte, si la suspensión de ADN ha sido obtenida según POE-PCR-02 pero procede de una muestra de características anómalas, el volumen recomendado podrá variar también (por ejemplo, en individuos aplasiados se incrementará el volumen y en LLC se disminuirá). En cualquier caso, siempre que varíe el volumen de ADN, ajustar el volumen final de la reacción PCR con H<sub>2</sub>O destilada.

**Concentración de Taq DNA polimerasa:** El volumen de Taq DNA polimerasa podrá variar en función de la actividad de la misma.

3. Para cualquier placa de tipaje, mezclar primero la Master Mix *Olerup SSP*™ con la Taq DNA polimerasa (5u/µl) y el H<sub>2</sub>O destilada y sembrar 10 µl de esta mezcla en el pocillo de la placa destinado al control negativo (si lo hay – consultar el prospecto correspondiente en caso de duda-). A continuación añadir la cantidad correspondiente de ADN de la muestra, mezclar bien y dispensar 10 µl de la mezcla preparada en cada uno de los demás pocillos de la placa de tipaje *Olerup SSP*™ correspondiente. Tapar la/s placa/s.



4. Anotar en el libro de trabajo del laboratorio las muestras que van a tiparse y el tipaje que va a realizarse, según el nº de orden en que se han colocado en cada gradilla. Indicar la fecha.
5. Transportar la/s gradilla/s al laboratorio de amplificación-detección.

En el laboratorio de amplificación-detección:

- Amplificación:

Colocar la gradilla en el termociclador y ejecutar el programa Olerup:

Hold: 94°C, 2'

Cycl (10x): 94°C, 10'' + 65°C, 1'

Cycl (20x): 94°C, 10'' + 61°C, 50'' + 72°C, 30''

Hold: Forever 4°C

La detección puede realizarse una vez concluido el último ciclo. Si la detección no se realiza inmediatamente, la gradilla puede permanecer en el termociclador a 4°C hasta el día siguiente o en nevera (4-8°C) hasta una semana.

- Detección:

Realizar directamente la siembra del volumen total contenido en los pocillos de cada placa de tipaje y teniendo en cuenta que, en cada placa, el pocillo nº 1 viene marcado con el nº de lote de la placa y, además, si estaes de más de 8 pocillos, con el nº 1, y la orientación de la placa es la siguiente (véase, por ejemplo, una placa de tipaje *Olerup SSP<sup>TM</sup>* de 48 pocillos):

1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48

Una vez concluida la carrera electroforética (10-15 min), examinar el gel bajo luz UV y documentar con una foto.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Criterios de aceptación:**

En general, para cada tipaje deberá verse:

1. La banda de control interno (de peso molecular 800 ó 1070 pb, si se trata de un tipaje de clase I, o de 430 ó 515 pb, si se trata de un tipaje de clase II) en todos los pocillos.
2. Una o varias bandas específicas de intensidad suficiente, cuyo peso molecular será generalmente inferior al de la banda de control interno y vendrá detallado en la tabla de especificidades suministrada con cada lote concreto de placas de tipaje *Olerup SSP™*. Hay que tener en cuenta que la intensidad de la banda control a menudo decrece e incluso puede llegar a desaparecer en presencia de fragmento específico.
3. Ausencia de banda en el pocillo de control negativo.

También se aceptarán como válidos los tipajes en los que no se observe banda de control interno en ningún pocillo pero sí se detecten las bandas específicas correspondientes a un tipaje de dos alelos (o grupos de alelos) diferentes (heterocigotos) con suficiente intensidad.

En los casos en que existan pocillos concretos en los que no se observe ni banda específica ni banda de control interno, no solo en la foto del tipaje sino también bajo la observación directa del gel, cuando se realice la interpretación con el *software* "HELMBERG-SCORE™", anular estos pocillos en la edición del gel y valorar el tipaje obtenido. Si se obtiene un resultado con tolerancia 0, este tipaje puede ser aceptado tras la validación por el Supervisor/Facultativo responsable. Si no, confirmar el tipaje repitiendo la técnica.

#### **4.2 Criterios de rechazo:**

No se aceptará como válido:

1. Cualquier tipaje en el que, no detectándose las bandas de control interno, se observe una o más bandas específicas de intensidad suficiente correspondientes a un tipaje homocigoto (de un solo alelo o grupo de alelos);
2. Una o varias bandas específicas de cualquier tipaje en el que, no detectándose las bandas de control interno, se observe una o más bandas específicas de intensidad suficiente correspondientes a un tipaje homocigoto (de un solo alelo o grupo de alelos).
3. Cualquier tipaje en el que se detecte banda en el pocillo del control negativo.
4. Cualquier tipaje en el que se detecten bandas correspondientes a un tipaje de más de dos alelos.

En el caso de que un tipaje sea invalidado por causas correspondientes a los apartados i o ii, repetir el proceso desde el paso 1 en el laboratorio de pre-amplificación, siguiendo las indicaciones oportunas del Supervisor/Facultativo responsable. En algunos casos, y cuando así lo aconseje el

Supervisor/Facultativo responsable, puede ser conveniente repetir el proceso de extracción de ADN a partir de una nueva muestra.

En el caso de que un tipaje sea invalidado por causas correspondientes a los apartados 2.3 y/o 2.4, realizar la descontaminación.

### **4.3 Análisis de interpretación mediante software:**

La interpretación por ordenador se realizará con el *software* "HELMBERG-SCORE™".

Para cada tipaje se seleccionará el lote correspondiente del reactivo utilizado. La interpretación primaria se realizará por el técnico y se validará por el Supervisor/Facultativo responsable. En el informe se hará constar la identificación del técnico y la del supervisor. El informe validado se imprimirá y adjuntará al *worksheet* del reactivo de tipaje utilizado, en el que constará, al menos, la identificación del reactivo, el lote, la fecha de caducidad, la fecha del ensayo, la identificación de la muestra y la identificación del técnico que ha realizado la prueba. En dicho *worksheet* se adjuntará también la foto del gel que documente el tipaje.

#### **4.3.1 Validación del programa de análisis:**

Siempre que haya alguna modificación en el *software* de análisis, ya sea por cambio de programa o por actualización de una nueva versión del que está en uso, se procederá a su validación antes de liberarlo para su uso. Para ello, se reanalizará una muestra en paralelo con la versión anterior y la actual, o se utilizará una muestra de tipaje conocido para verificar que el nuevo programa o la nueva versión del mismo funciona correctamente. Dicha verificación será realizada por el Supervisor/Facultativo Responsable, que firmará los informes correspondientes al tipaje con el nuevo *software*, lo cuales se archivarán como registro de autorización y liberación para su uso. La transmisión de la orden de liberación de uso del nuevo *software* a todo el personal del laboratorio se hará a través del libro de laboratorio, firmando todos los componentes como enterados de dicha orden.

#### **4.3.2 Actualización de la base de datos IMGT/HLA:**

La base de datos de la IMGT/HLA utilizada para la asignación de alelos HLA se actualizará al menos una vez al año (o con la frecuencia que indique el estándar de la EFI correspondiente) con la versión más actual. La transmisión de dicha actualización a todo el personal del laboratorio se hará a través del libro de laboratorio, firmando todos los componentes como enterados.

#### **4.4 Análisis de interpretación manual:**

En los casos en que se requiera realizar una interpretación manual del tipaje, se utilizará la tabla de especificidades suministrada con cada lote concreto de placas de tipaje *Olerup SSP*™ o, preferentemente, descargada su última actualización de la *web Olerup SSP*, y la asignación de los alelos se realizará en función de la combinación de las bandas específicas detectadas. En este caso, la foto del tipaje se adjuntará a la tabla de especificidades correspondiente, en la que se anotará la identificación de la muestra y la fecha de realización del ensayo y se firmará por el técnico que ha realizado la prueba.

#### **4.5 Emisión del informe de Histocompatibilidad final:**

El tipaje será supervisado por el Supervisor/Facultativo responsable, que lo validará definitivamente o dará las indicaciones oportunas para realizar las comprobaciones que estime necesarias.

Una vez el tipaje haya sido revisado y verificado por el Supervisor/Facultativo responsable, la auxiliar del laboratorio (o quien la sustituya en su ausencia) introducirá los resultados en la base de datos Hematos. El Facultativo responsable con acceso autorizado al programa Hematos será el encargado de validar los resultados *on line* para que el informe de Histocompatibilidad se encuentre disponible en la red a los Centros Hospitalarios de la Generalitat Valenciana debidamente autorizados.

### **5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

PR-HLA-16: Extracción de ADN.

PR-HLA-19: Electroforesis en gel de agarosa.

Informes del tipaje HLA emitidos por el programa HELMBERG-SCORE™.

Registro de validación cuando haya un nuevo *software* de análisis o una nueva versión del *software* en uso.

### **6. REGISTROS Y DATOS**

Código	Responsable	Plazo	Soporte	Codificación	Lugar archivo
Informe de Histocompatibilidad	Aux. laboratorio	Indefinido	Papel (copia)	Fecha	Laboratorio PCR-1

Datos	Soporte	Responsable	Plazo	Codificación	Copia de seguridad
Base de datos de HELMBERG-SCORE™	Informático	Técnicos	Indefinido	Identificación muestra	Cuando hayan modificaciones

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-25				
Edición	Fecha emisión			
02	04/06/2021	Fdo: Facultativo	Fdo: Jefe de Sección	Fdo: Jefe de Calidad

**OBJETIVO:**

Realizar el genotipaje KIR de baja resolución de los 16 genes KIR siguientes: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 2DP1, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1 y 3DP1, determinando su presencia o ausencia, mediante la técnica PCR-SSO.

**MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

- Kit SSO Genotyping Test
- Estreptavidina conjugada con ficoeritrina
- H<sub>2</sub>O destilada
- Etanol 70%
- Lejía
- Fluido del sistema
- Micropipetas de volumen ajustable
- Puntas "RNase free" con filtro
- Material fungible (tubos, cubiertas) adaptable a los termocicladores
- Tubos eppendorf
- Gradilla para termociclador
- Guantes desechables
- Termocicladores
- Citómetro y accesorios del sistema.

**DIRIGIDO A:**

Personal del laboratorio de Histocompatibilidad (HLA)

## **DESARROLLO:**

### **1. En el área de Pre-amplificación:**

Anotar en el libro de trabajo del laboratorio las muestras que van a tiparse perfectamente identificadas, según el n° de orden en que se han colocado en la gradilla de amplificación. Indicar la fecha.

### **Preparación mezcla D-Mix, Primers específicos y Taq:**

- ✓ Encender el termociclador para calentar la tapa.
- ✓ Descongelar, primers y D-Mix. Mantener en hielo hasta su uso.
- ✓ Ajustar la concentración de ADN aproximadamente a 20 ng/μl utilizando agua estéril (la relación A260/A280 debe ser del orden de 1,65 - 1,90 por espectrofotometría).
- ✓ Agitar en vórtex la D-Mix y el Primer durante 15 segundos; centrifugar durante 3-5 segundos.
- ✓ Preparar tres reacciones de amplificación separadas para cada muestra de ADN. Estas reacciones de PCR utilizan mezclas de primers para el exón 3+4 de KIR (grupo 1), el exón 5 (grupo 2) y el exón 7-9 (grupo 3).
- ✓ Utilizando la Tabla que aparece a continuación, mezclar el volumen indicado de D-Mix y primers. Agitar en vórtex durante 15 segundos y colocar en hielo.

# of Reactions	D-mix (μl)	Amplification Primer (μl)	Taq Polymerase (μl)
1	13.8	4	0.2
10	138.0	40	2.0
50	690.0	200	10.0
96	1491.0	432	21.6 (22)

- ✓ Pipetear 2 μl de ADN (aproximadamente a 20-30 ng/μl) en el fondo de un tubo (para un volumen final de 20 μl por reacción de PCR) –se puede dispensar 1μl de DNA a 40-60 ng/μl añadiendo 1μl más de dH2O, ó 3 μl de DNA –sin dH2O- si la concentración es inferior a 20 ng/μl)-
- ✓ Añadir la cantidad adecuada de Taq polimerasa (por ejemplo, 0.2 μl por reacción de 20 μl) a la mezcla de amplificación (para un pipeteo preciso de la Taq polimerasa, se recomienda preparar la mezcla para al menos 10 reacciones).
- ✓ Vortear durante unos segundos, y centrifugar durante 3-5 segundos.

- ✓ Añadir un alícuota de 18  $\mu$ l de la mezcla de amplificación en cada pocillo que contiene ADN (para evitar la contaminación cruzada, asegurarse de no tocar el ADN prealícuotado en el fondo) y sellar la placa
- ✓ Sellar la placa y transportarla al área de amplificación-detección.

Se admite la variante del método estándar utilizando la mitad del volumen de cada uno de los reactivos que a continuación se especifican (por una unidad):

REACTIVO AUTORIZADO MITAD	VOLUMEN ESTÁNDAR	VOLUMEN
D-mix	13.8 $\mu$ l	6.9 $\mu$ l
Primer amplificación	4.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l
DNA	2.0 $\mu$ l (20ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l (20 ng/ $\mu$ l)

## 2. En el área de amplificación-detección:

### 2.1. Amplificación

Asegurarse que la tapa del termociclador está ya caliente y ejecutar el programa de PCR indicado (para el GeneAmp 9700, ajustar la "velocidad de rampa" al programa 9600):

Hold: 96°C, 3 min  
 Cycl (5x): 96°C, 20 seg  
                   60°C, 20 seg  
                   72°C, 20 seg  
 Cycl (30x): 96°C, 10 seg  
                   60°C, 15 seg  
                   72°C, 20 seg  
 Hold: 72°C, 10 min  
 Hold: Forever 4°C.

### 2.2. Detección:

#### 2.2.1. Puesta en marcha del Citómetro Luminex LABScan™:

Para encender el Citómetro, seguid el orden siguiente:

- 1º Plataforma.
- 2º Equipo.
- 3º Ordenador.

Nota: El sistema de fluidos debe estar siempre conectado. Comprobad que haya fluidos de sistema en la garrafa y el nivel de la de desechos.

Tras conectar el ordenador aparece en pantalla el menú de la pestaña Home, del cual hay que ejecutar el Daily Startup, que consta de cuatro botones:

1. **Warmup:** Calentamiento del láser. El calentamiento comienza automáticamente al encender el equipo (aunque no se ejecute este comando) y tarda 30 minutos. Una vez caliente, se mantiene hasta 4 horas con el equipo inactivo (y todo el tiempo necesario mientras el equipo está en funcionamiento)
2. **Prime:** Cebado de los conductos del equipo (para eliminar el aire) con líquido del sistema que el equipo toma directamente de la garrafa, por lo que no es necesario disponer ningún líquido en el reservorio
3. **Wash:** Lavado. Realizad siempre con agua destilada. El equipo toma el agua del reservorio o de un pocillo de la placa de lectura (según se haya programado)

Realizad 3 lavados con líquido del sistema. Para ello...

Pulsad el botón Wash.

Picad EJECT para sacar el soporte y rellenad la cubeta con fluido del sistema. Cerrad y OK. Repetir 2 veces más el lavado pulsando Wash y luego OK.

4. **Alcohol Flush:** Lavados con alcohol (etanol al 70%) utilizados para eliminar burbujas de aire. El equipo toma el alcohol del reservorio (en un pocillo de la placa no hay suficiente volumen).

NOTA: Si tardamos más de dos horas en trabajar el láser se apagará, por lo que habrá que pulsar Warmup de nuevo y esperar 30 minutos, a que caliente de nuevo el láser.

### 2.2.2. Desnaturalización/ neutralización:

1. Preparar una bandeja de hielo picado.
2. Transferir 5 µl de cada muestra de producto amplificado a un pocillo de una placa de 96 pocillos, asegurándose de la ubicación de la muestra en la placa.
3. Añadir 2,5µl de tampón de desnaturalización. Mezclar bien (preferiblemente pipeteando arriba y abajo), e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Añadir 5 µl de Tampón de Neutralización y mezclar bien (preferiblemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo). Observad el cambio de color de rosa-anaranjado a transparente o amarillo pálido (si algún pocillo no vira de color puede añadirse 1 ó 2 µl más de tampón neutralizante, hasta que vire a color amarillo).
5. Colocar la placa PCR con el producto PCR neutralizado en un baño de hielo o equivalente mientras se prepara la Hibridación.
6. Poned el termociclador en el programa incuba de 60°.

### 2.2.3. Hibridación



**Preparación mezcla hibridación:**

Multiplicad las siguientes cantidades por el número de muestras a tipar más uno:

17  $\mu\text{l}$  de Tampón de Hibridación, y  
2  $\mu\text{l}$  de Beads específicos (agitar muy bien en el vortex antes de coger la cantidad deseada).

7. Dispensad **19  $\mu\text{l}$**  de la mezcla por pocillo y vortexear.
8. Incubar en el termociclador durante 15 minutos a 60°C (programa incuba).
9. Añadir rápidamente 70  $\mu\text{l}$  de Tampón de lavado.
10. Centrifugar 5 min a 2800 rpm
11. Sacudir la placa, secar con un papel absorbente y repetir el lavado 2 veces más.

**Preparación mezcla SAPE:**

12. Multiplicad las siguientes cantidades por el número total de muestras y añadir 2 más:

**24,8  $\mu\text{l}$**  de Tampón Sape  
**0,25  $\mu\text{l}$**  de Espretavidina (fluorocromo).

13. Dispensad 24,5  $\mu\text{l}$  de la mezcla por pocillo.
14. Incubar en el termociclador 60° durante 5 minutos (programa incuba).
15. Añadir rápidamente 70  $\mu\text{l}$  de Tampón de lavado.
16. Centrifugar 5 min a 2800 rpm
17. Extraer el sobrenadante y secar con un papel absorbente.
18. Añadir 70  $\mu\text{l}$  de Líquido del sistema.
19. Mezclar bien y transferir todo a la placa de lectura para leer en el Luminex.

**2.2.4. Adquisición de datos.**

Para la adquisición de datos se puede consultar el documento “Manual del usuario LABScan3D™ de One Lambda, tecnología XMAP Luminex”.

**3. Mantenimiento rutinario y preventivo del Equipo Luminex LABScan™**

Diariamente se realizará las tareas de mantenimiento consistentes en el programa llamado “Arranque” (antes de empezar a utilizar el citómetro) y al finalizar el trabajo del día se llevará a cabo el programa denominado “Parada”.

Verificar el LABScan™ con sus calibradores y controles siempre que ocurra alguna de las siguientes situaciones:

- a) haya  $\pm 3^\circ$  de diferencia respecto a la temperatura de calibración anterior, o
- b) se cambie el Fluido, o
- c) haya una reparación/instalación del citómetro.

En ausencia de cualquier problema, pasar los calibradores y controles una vez al mes.

Registrar el mantenimiento en el IM-HLA-18A.

## **RESULTADOS**

El análisis de resultados se realiza a través del programa FUSION-KIR.

Para detalles sobre el manejo del *software* Fusion-KIR, consultar el documento externo "Manual del usuario HLA FUSION™ RESEARCH SOFTWARE" de One Lambda, en su versión más actualizada.

Las actualizaciones de las nuevas versiones del software se realizarán por el técnico de Rafer. Se validará su uso con respecto a la versión anterior con una muestra patrón.

### **Criterios de aceptación:**

Tras la adquisición de datos en el Luminex y asignación de un determinado tipaje KIR por el programa Fusion, solo se aceptarán como válidos los resultados cuando el cómputo del nº total de beads analizados sea superior a 30. La intensidad de fluorescencia (IF) de los controles positivos debe encontrarse entre 1000 y 8000 IF, según el lote. No obstante, en algunos casos puede encontrarse el valor de IF fuera de rango y no afectar al tipaje; en estos casos, el Facultativo/Supervisor dará las indicaciones oportunas para realizar las comprobaciones que estime necesarias.

Dado un resultado aceptado, se procederá a la emisión del informe de genotipaje KIR de una muestra dada. En este informe siempre se hará constar la identificación del técnico que ha realizado el ensayo, con su firma y de la persona que ha revisado y confirmado este análisis (el Facultativo/Supervisor).

### **Criterios de rechazo:**

No se aceptará como válido un tipaje cuando el cómputo del nº total de bolas analizadas sea inferior a 30. También se invalidarán los resultados cuando la IF para las sondas de los controles positivos, se encuentren fuera del rango entre 1000 y 8000IF y no se detecten patrones de reacción asignables. En ambos casos, y siempre que no se produzca asignación de tipaje, se procederá a la repetición del ensayo en las condiciones recomendadas por el responsable.

Una vez el tipaje haya sido revisado y verificado por el Supervisor/Facultativo responsable, la auxiliar del laboratorio (o quien la sustituya en su ausencia) introducirá los resultados en la base de datos Hematos (presencia/ausencia de genes KIR como +/-, respectivamente).

En el informe de Genotipaje KIR, además de los genes KIR se hará constar:

**-Identificación del Genotipo KIR:** Si procede, se indicará la identificación del Genotipo KIR en función del tipaje obtenido, a través de la web <http://allelefrequencias.net/kir6001a.asp>, en su actualización más reciente (*Allele frequency net database (AFND) 2020 update*).

**-Conclusión:** Si procede, y la muestra tipada pertenece a un potencial donante de un trasplante de progenitores hematopoyéticos, se indicará la clasificación de dicho donante en *Neutral, Better o Best*, según la calculadora *on line* del contenido en genes KIR-B del donante, disponible en la base de datos IPD-KIR ([https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor\\_b\\_content.html](https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html)).

**-Grupo de Haplotipos KIR:** Si procede, se indicará el Grupo de haplotipos KIR en función del tipaje obtenido, clasificado en AA, BB o B/x, a través de la web <http://allelefrequencias.net/kir6001a.asp>, en su actualización más reciente (*Allele frequency net database (AFND) 2020 update*). Además, **se indicará el contenido en genes KIR B en centrómero y telómero (Cen\_Tel), calculado según el artículo:** “S Cooley, DJ Weisdorf, LA Guethlein, JP Klein, T Wang, CT Le, SGE Marsh, D Geraghty, S Spellman, MD Haagenson, M Ladner, E Trachtenberg, P Parham and JS Miller. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* (2010) 116:2411-9”.

El Facultativo responsable con acceso autorizado al programa Hematos será el encargado de validar los resultados *on line* para que el informe se encuentre disponible en la red a los Centros Hospitalarios de la Generalitat Valenciana debidamente autorizados.

## **DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

PR-HLA-16: Extracción ADN

PR-HLA-17: Medida de la concentración de ADN

PR-HLA-19: Electroforesis

PR-HLA-40: Detección de la contaminación de ADN

### **Documentos Externos:**

Prospecto técnico KIR SSO Genotyping Test de One Lambda.

Manual del usuario LABScan3D™ de One Lambda, tecnología XMAP Luminex (en el ordenador se puede consultar el documento completo: Valencia/PCR/EVALUACIONES/KIR).

Manual del usuario HLA FUSION™ RESEARCH SOFTWARE™ de One Lambda (en el ordenador se puede consultar el documento completo: Valencia/PCR/EVALUACIONES/KIR)

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-29		Fdo: Facultativo	Fdo: Responsable	Fdo: Jefe de Calidad
Edición	Fecha emisión			
01	18/03/20			

### **OBJETIVO**

Realizar el tipaje HLA por secuenciación (SBT), siguiendo el protocolo “SBTexcellerator” de GenDx y análisis mediante el *software* SBTengine®.

### **DIRIGIDO A**

Personal HLA autorizado para realizar técnicas de secuenciación.

### **MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

En el laboratorio de pre-amplificación (laboratorio PCR-1 del CTCV):

- Reactivos pre-PCR de los kits SBT excellerator (HLA Core kit) y GenDx-LongRange
- Material fungible y accesorio propio del termociclador
- Pipetas propias del laboratorio pre-PCR
- Material fungible propio del laboratorio pre-PCR

En el laboratorio de amplificación-detección (laboratorio PCR-2):

- Reactivos post-PCR del kit SBT excellerator
- Agua destilada
- Formamida
- Exoisap
- NaOAC/EDTA
- Big Dye terminators y correspondiente buffer
- Etanol absoluto y al 80%
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700
- Equipo de electroforesis y documentación de geles
- Secuenciador ABI 3100 de 16 capilares
- Centrífuga
- Pipetas propias del laboratorio post-PCR

- Láminas adhesivas de sellado de placas PCR normales y resistentes al EtOH
- Material fungible y accesorio propio del termociclador
- Material fungible y accesorio propio del secuenciador
- Material fungible propio del laboratorio post-PCR

## **DESARROLLO**

### **1. Preparación de la muestra para PCR.**

En el laboratorio de pre-amplificación:

1.1 Anotar en el libro de trabajo de secuenciación del laboratorio las muestras que van a tiparse en el orden en que van a colocarse en la placa de amplificación.

1.2 Ajustar la concentración de ADN de cada muestra entre 15-30 ng/μl diluyendo con agua destilada. En el caso del locus DRB1, preparar el doble de concentración de ADN. Conviene que la pureza de las suspensiones de ADN sea > 1.7.

1.3 Preparar, por locus, la mezcla de amplificación (Mix) en un tubo eppendorf, siguiendo los volúmenes recomendados en la siguiente tabla por cada muestra a testar (para este cálculo, se puede utilizar un Excel disponible en el ordenador del laboratorio):

Componente	Vol (μl)
H2O nuclease free	19,85
Taq LongRange	0,4
Buffer LongRange	2,5
dNTPs	1,25
Primers locus	1
Total	21

1.4 En una placa de PCR, dispensar las muestras de DNA, a un volumen de 4 μl, y a continuación 21 μl de la Mix preparada para cada locus. Tapar la placa.

1.5 Transportar la gradilla al laboratorio de amplificación-detección.

### **2. Amplificación.**

En el laboratorio de amplificación-detección:

Ejecutar el programa de amplificación con el siguiente perfil térmico, colocando la gradilla en el termociclador cuando esté alcanzando los 95°C:

Hold: 95°C, 3 min

Cycl (35x): 95°C, 15 seg + 65°C, 30 seg + 68°C, 6 min

Hold: 68°C, 10 min, Forever 15°C

La secuenciación puede realizarse una vez concluido el último ciclo. Si la secuenciación no se realiza inmediatamente, la gradilla puede permanecer en el termociclador a 15°C hasta el día siguiente o en nevera (4-8°C) hasta una semana.

### 3. Purificación enzimática de los productos PCR.

Los residuos de primers de amplificación, polimerasa, dNTPs y ADNs de simple cadena producidos durante la PCR o contaminantes de la muestra se destruyen después de la PCR con una mezcla enzimática: ExoI (exonucleasa) y SAP (fosfatasa alcalina) a razón de 1 µl de cada una por muestra.

1. Destapar la placa de tubos PCR y transferir 10 µl de cada pocillo a otra placa.
2. Añadir 2 µl de la mezcla ExoSAP
3. Tapar la placa y dar un pulso de centrifugación.
4. Colocar en el termociclador con el siguiente programa térmico:  
Hold: 37°C, 30 min  
Hold: 80°C, 20 min  
Hold: Forever 15°C

### 4. Reacción de secuenciación.

5. Preparar la Mix de Secuenciación (Mix-Seq) en un tubo eppendorf, siguiendo los volúmenes recomendados en la siguiente tabla por cada muestra a testar:

Componente	Vol (µl)
H2O nuclease free	5,75
Buffer BDT	1,5
BDTs	1
Total	8,25

6. Añadir a una nueva placa 1 µl del producto PCR dependiendo de los primers de secuenciación que se requieran en cada locus. Añadir 1 µl del primer de secuenciación.
7. Transferir 8 µl de Mix-Seq. Dar un pulso de centrifuga
8. Tapar la placa, colocar la gradilla en el termociclador y ejecutar el programa con el siguiente perfil térmico:  
Hold: 96°C, 10 s  
Cycl (25x): 96°C, 10 seg + 50°C, 10 seg + 60°C, 2 min  
Hold: Forever 15°C

## 5. Purificación de los productos de secuenciación.

En el proceso de purificación se eliminan los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir en la lectura del secuenciador.

### Purificación de secuencias por Precipitación Etanólica:

Los reactivos utilizados y en las cantidades referidas han sido validados para la técnica de tipaje SBT-GENDX:

Material empleado:

- Buffer NaOAc/EDTA.
- Centrifuga de placas.
- Etanol 100 %
- Reacciones de secuenciación.

Procedimiento:

1. Añadir 2  $\mu$ L de buffer NaOAc/EDTA a cada reacción de secuenciación depositando la gota en la pared lateral con una pipeta multicanal.
2. Centrifugar la placa brevemente para asegurar que el buffer NaOAc/se mezcla adecuadamente con la reacción de secuenciación (5 segundos a 500 X g).
3. Añadir 25  $\mu$ L EtOH 100% a cada reacción de secuenciación.
4. Sellar la placa con un cubre resistente a etanol.
5. Vortear la placa vigorosamente.

NOTA: Si no se mezcla adecuadamente podemos obtener secuencias de baja calidad.

6. Centrifugar a 2000 X g durante 30 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante invirtiendo la placa en papel secante. Centrifugar la placa invertida a 50-100 X g durante 10 segundos.

NOTA: Verificar que el pocillo queda seco.

8. Añadir 50  $\mu$ L EtOH 80% a cada reacción de secuenciación.
9. Centrifugar a 2000 X g durante 5 minutos.
10. Repetir paso 7.
11. Añadir 15 $\mu$ L de formamida a cada pocillo para resuspender las secuencias.
12. Centrifugar la placa brevemente para asegurar que el contenido se queda en el fondo del pocillo
13. Desnaturalizar las secuencias en un termocicladores durante 2 minutos a 95 °C.

## 6. Secuenciación automática en el Secuenciador ABI 3100 de 16 capilares.

Parámetros validados del sistema SuBiTo para la electroforesis en un secuenciador de 16 capilares ABI Prism® 3100 con matriz gel POP6 y capilar de 50cm (datos disponibles en los parámetros del secuenciador “Module Manager>GENDX>Edit y Protocol Manager>Analysis protocol>GENDX>Edit):

Parámetro	Valor
Sequence Analysis Protocol	GENDX
Dye Set	KB_3100_POP6_BDTv1.mob
Basecaller	KB.bcp
Run Module	StdSeq50_POP6
Injection Time	22 seconds
Default Run Time	6500 seconds

*Software de recogida de datos para usar con ABI Prism® 3100: Data Collection v2.0 o superior.*

1. Colocar la placa en la bandeja de inyección automática del secuenciador.
2. Preparar el archivo de la sesión de trabajo identificando las muestras perfectamente y ubicándolas dentro de la placa de secuenciación. Para ello, entrar en “Run 3100 Data Collection” y seleccionar, sucesivamente: “Foundation Data Collection”, “ga3100”, “Plate Manager” y New.
3. Identificación de la sesión:

Name: aammdd

Owner name: nombre del operador

Operator name: nombre del operador

Application: Sequencing Análisis

Identificación de las muestras en la lista de trabajo:



NºregistroCTCV\_HLAlocus\_Ex2F/2R/3F/3R/4F/4R..... en función de los exones de cada locus

En el caso del DR, el 2F se divide en 2Fa1 y 2Fa2 y tiene el R8 (codón 86)

En el caso del C el 3F se divide en 3Fa1 y 3Fa2

Si hay alguna secuenciación de segundo nivel, identificar la muestra como:  
*NºregistroCTCV\_HLAlocus\_IdentificaciónHarp*

Una vez confeccionada la sesión, entrar en “ga3100” y seleccionar “ABI3100” y “Run”; activar el “Play”.

### **7. Análisis de secuencias con el software SBTEngine.**

Una vez finalizada la secuenciación, entrar en la carpeta de la sesión y copiar las secuencias en un USB para incorporarlas al software de secuenciación SBTEngine disponible en el ordenador del laboratorio.

El proceso será como sigue:

1. Importar las secuencias en la carpeta GENDX, subcarpeta Runs.
2. Analizar muestra por muestra, revisando detenidamente las posiciones de baja calidad, las heterocigotas, las que presentan *mismatches*...
3. Si todo está correcto, proceder con la validación técnica y de supervisión
4. Imprimir el informe.

Para detalles sobre el manejo del *software* SBTEngine, consultar el documento externo “Instrucciones de uso de SBTEngine®” de GENDX.

### **RESULTADOS**

El tipaje será supervisado definitivamente por el Supervisor/Facultativo responsable del área, que lo validará definitivamente o dará las indicaciones oportunas para realizar las comprobaciones que estime necesarias.

### **Segundo nivel de secuenciación:**

En el caso en que el resultado de tipaje de lugar a ambigüedades que se puedan resolver con primers de secuenciación de segundo nivel, anotarlos en el libro de trabajo y preparar la muestra en cuestión para secuenciar con el primer de segundo nivel recomendado por el software SBTEngine, empezando el proceso desde el paso de reacción de secuenciación (3.2.4).

Si no hay disponibles primers de secuenciación de segundo nivel, valorar la resolución de ambigüedades realizando tipaje de alta resolución por subtipaje alélico por SSP.

**Criterios de rechazo:** no se aceptará como válida ninguna secuencia:

21. en la que haya un número considerable de picos de baja calidad;
22. en la que haya un número elevado de *mismatches*.

**Criterios de aceptación:** se aceptará como válidos aquellos casos en que habiendo secuencias en ambas direcciones, una de ellas presente regiones de baja calidad que puedan ser obviadas por estar perfectamente claras las bases correspondientes de la secuencia complementaria.

**Confirmaciones de resultados validados:** Se comprobarán aquellos casos validados en que:

1. El resultado sea un tipaje homocigoto, procediéndose a confirmar dicho tipaje por alguna otra técnica (SSP o rSSO).
2. El resultado tenga uno (o más) *mismatches*: dicha muestra se confirmará realizando el tipaje de alta resolución por rSSO o por subtipaje alélico SSP;
3. El resultado corresponda a 0 *mismatches* pero dé lugar a una combinación alélica poco frecuente: dicha muestra se confirmará realizando el tipaje de alta resolución por rSSO o por subtipaje alélico SSP.
4. El resultado del tipaje incluya un alelo nulo imposible de descartar por SBT; en ese caso se realizará el subtipaje alélico por SSP para descartar el alelo nulo.

Para solución de problemas se recomienda consultar el documento externo “SBTexcellerator Instructions For Use” de GENDX.

Una vez el tipaje haya sido revisado y verificado por el Supervisor/Facultativo responsable, la auxiliar del laboratorio (o quien la sustituya en su ausencia) introducirá los resultados en la base de datos Hematos. El Facultativo responsable con acceso autorizado al programa Hematos será el encargado de validar los resultados *on line* para que el informe de Histocompatibilidad se encuentre disponible en la red a los Centros Hospitalarios de la Generalitat Valenciana debidamente autorizados.

## **DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

Documento externo “Instrucciones de uso de SBTengine®” de GENDX.

Documento externo “SBTexcellerator Instructions For Use” de GENDX.

**REGISTROS Y DATOS**

Código	Responsable	Plazo	Soporte	Codificación	Lugar archivo
Informe de Histocompatibilidad	Aux. laboratorio	Indefinido	Papel (copia)	Fecha	Laboratorio PCR1

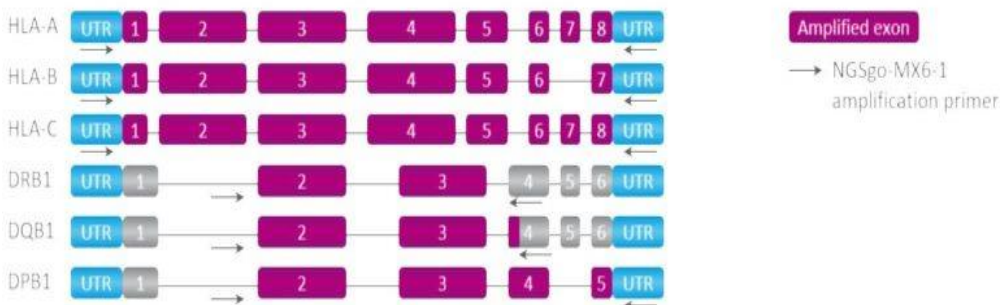
Datos	Soporte	Responsable	Plazo	Codificación	Copia de seguridad
Base de datos Hematos	Informático	Informática	Indefinido	Nº registro o Nombre paciente	Diaria
Base de datos "ABI Data Collection"	Informático	Técnicos	Indefinido	Identificación muestra	Cuando hayan modificaciones
Base de datos "SBTEngine"	Informático	Técnicos	Indefinido	Identificación muestra	Cuando hayan modificaciones

**TIPAJE HLA POR NGS *Multiplex*:  
PROTOCOLO NGSgo®-MX6 EN  
PLATAFORMA ILLUMINA**

Código		Realizado	Revisado	Aprobado
PR-HLA-43				
Edición	Fecha emisión			
01	26/02/21	Fdo: Facultativo	Fdo: Jefe Sección	Fdo: Jefe Calidad

**OBJETIVO**

Realizar el tipaje HLA por NGS en formato multiplex siguiendo el protocolo “NGSgo®-MX6” de GenDx, en plataforma Illumina y análisis mediante el *software* NGSengine®. Los 6 *loci* amplificados simultáneamente y su cobertura son:



**DIRIGIDO A**

Personal HLA formado para realizar técnicas de secuenciación-NGS.

**MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

En el laboratorio de pre-amplificación:

- Reactivos pre-PCR de los kits “NGSgo®-MX6”
- Material fungible y accesorio propio del termociclador
- Pipetas propias del laboratorio pre-PCR
- Material fungible propio del laboratorio pre-PCR

En el laboratorio de amplificación-detección:

- Reactivos post-PCR del kit “NGSgo®-MX6”
- Agua destilada

- Etanol absoluto y al 80%
- Centrífuga
- Qubit y material fungible y accesorio propio
- Termociclador Verity y material fungible y accesorio propio
- Equipo de electroforesis y documentación de geles
- MiniSq Illumina y material fungible y accesorio propio
- Pipetas propias del laboratorio post-PCR
- Material fungible propio del laboratorio post-PCR

## DESARROLLO

### Día 1:

#### **I. Preparación de la muestra para PCR: AMPLIFICACIÓN MX6-1:**

En el laboratorio de pre-amplificación:

- Anotar en el libro de trabajo de NGS del laboratorio las muestras que van a tiparse en el orden en que van a colocarse en la placa de amplificación.
- Ajustar la **concentración de ADN** de cada muestra **entre 20-80 ng/μl** (óptimo 60 ng/μl) diluyendo con H<sub>2</sub>O (nucleasa free). Conviene que la pureza de las suspensiones de ADN sea > 1.7.
- **Trabajar en frío:** Descongelar, vortear y dar un spin a los reactivos del kit NGSgo®-MX6 (mix, agua y primers). Preparar la mezcla de amplificación en un tubo eppendorf siguiendo los volúmenes recomendados en la siguiente tabla (para distinto nº de muestras, calcular las cantidades en el EXCEL “Cálculos amplificación Mx6”, introduciendo simplemente el nº de muestras a procesar):

Componente	Código Color Tapón	Volumen por muestra (μl)	Volumen total para 24 muestras (μl)
H <sub>2</sub> O (Nucleasa free)	Blanco	6.03	159,19
Mix (GenDx-LongMix)	Negro	3.75	99,0
Primer (NGSgo®-MX6-1)	Verde	1.50	39,60
Enhancer (NGSgo®-AmpX)	Verde	1.72	45,41
<b>Volumen total</b>		<b>13.00</b>	<b>343.20</b>

- En una placa de PCR, dispensar **13 μl de mix** por pocillo.
- Añadir **2 μl de cada muestra de DNA** (concentración entre 20-80 ng/μl). Por debajo de 20 ng/μl se puede añadir hasta 3 μl, por encima de 80 ng/μl ajustar entre 20 y 80 ng/μl y poner los 2 μl.

- En cada sesión, incluir un **control negativo** para detectar una posible contaminación

- Cada dos meses, incluir también dos controles de **wipe-test** (al menos bancada de trabajo pre-amplificación y nevera de muestras o reactivos pre-amplificación) y documentar con una foto.

**Nota: La cantidad óptima de ADN molde inicial para obtener el tamaño óptimo de insertos y concentración de librería es 120 ng (rango en 40 y 160 ng), con una pureza  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ .**

- Sellar la placa, vortear y dar un spin. Transportar la gradilla al laboratorio de amplificación -detección.

## II. Amplificación.

En el laboratorio de amplificación-detección:

Ejecutar el programa de amplificación con el siguiente perfil térmico (rampa 77%):

NGSgo-MX6-1		Temp	Time
Desnaturalización inicial		95°C	3 min
25 ciclos	Desnaturalización	95°C	15 seg
	Alineamiento	65°C	30 seg
	Elongación	68°C	5 min
Elongación final		68°C	10 min
Enfriamiento		15°C	∞

La gradilla puede permanecer en el termociclador a 15°C hasta el día siguiente o en nevera (4-8°C) hasta una semana.

Descartar posible contaminación de los amplicones y comprobar la existencia de productos de amplificación corriendo las muestras amplificadas + control negativo en un gel de agarosa al 1%: 2 µl de producto amplificado (o control) + 3 µl tampón de carga [ver PR-HLA-19: para una cubeta de 250ml: 225ml agua destilada, 25 tampón electroforesis, 2.5g de agarosa y 30 µl de SylverSafe]. El tamaño aproximado de los amplicones está entre 3.1 a 5.7Kb.

Punto seguro para parar

## Día 2:

### III. Fragmentación enzimática.

- 4 Descongelar los reactivos de fragmentación, vortear y dar un spin [☉ : **Soluciones enzimáticas (Fragmentase y EndPrep) no vortear, solo mezclar despacio mediante pipeteo**].

## 5 Preparar la mix (trabajar sobre el hielo)

Componente	Código Color Tapón	Volumen por muestra (µl)	Volumen total para 24 muestras (µl)
H <sub>2</sub> O (Nucleasa free)	Blanco	24.25	627.75
Fragmentase Buffer	Blanco	2	54
End Prep Buffer	Verde	3.25	87.75
● Fragmentase Enzyme**	Blanco	1.5	40.5
● End Prep Enzyme**	Verde	1.5	40.5
Volumen total		32.5	

- 6 Añadir **2 µl de amplicón** en cada pocillo de la placa. *Ojo: Fijarse bien porque es poco volumen con la multicanal y tener la placa en hielo.*

Nota: **La cantidad de producto amplificado debiera estar en el rango 50-1000 ng (óptimo 250 ng).** Se puede normalizar la concentración de cada amplicón/muestra a 250 ng. Sin embargo, la cuantificación de los amplicones no es necesaria ya que se supone que 2 µl de amplicón deben estar en el rango de la cantidad óptima 250 ng.

- 7 Mezclar y distribuir 30,5 µl de mix por pocillo.  
 8 Sellar, vortear, dar un spin y poner en el termociclador (**NGS-Fragmentación**)

	Tiempo	Temperatura
Fragmentación y reparación de errores	20 min	25°C
dA-tailing	10 min	70°C
Enfriamiento		15°C

\* Paso no seguro para parar. Proceder inmediatamente con la ligación de adaptadores.

Nota: **Para tamaños de fragmentos y rendimiento de librería óptimos, la fragmentación, la ligación de adaptadores y la purificación deben realizarse consecutivamente.**

## IV. Ligación de Adaptadores.

- 9 Durante los 30 min de termociclador (**NGS-Fragmentación**):
- Preparar etanol: 30ml, 80% (6 ml de agua+24ml de etanol)
  - Atemperar beads

- Descongelar cartucho (también se puede sacar el día anterior y dejar en nevera) y buffer Hyb

10 Preparar la mix de ligación

Reactivo	Color tapa	Volumen (µl)/muestra	Volumen (µl) para 24 muestras
Ligase Mix	Rojo	7.5	210
Ligation enhancer	Rojo	0.5	14
Adaptador para Illumina	Rosa	0.25	7
Agua	Blanco	1	24
Volumen total		9.25	

11 INMEDIATAMENTE cuando acaba la fragmentación, poner la placa en hielo y pipetear 9.25 µl de la mix de ligación.

12 Sellar, vortear, dar un spin y poner en el termociclador (**NGS-Ligación**)

	Tiempo	Temperatura
Ligación de adaptadores	15 min	20°C
Enfriamiento	*	15°C

\* Paso no seguro para parar. Proceder inmediatamente con la purificación.

**V. Purificación con beads 0.45x y selección de tamaños.**

13 Dar un spin a la placa y seguir con la Purificación con beads AMPure XP (TA):

4. Vortear las beads
5. Pipetear 18.8 µl de beads por muestra. Sellar la placa, vortear y ponerla en el agitador 5 min.
6. Dar un pulso a la placa y ponerla sobre el soporte magnético **SIN** la pegatina
7. Incubar 5 min. Eliminar y descartar el sobrenadante.
8. Añadir 200 µl de etanol 80%, incubar 30 segundos. Eliminar y descartar el sobrenadante.
9. Repetir el paso e. dos veces más.
10. Eliminar todo el etanol residual con la pipeta de 10 µl.
11. Dejar seco el pellet (5 min). Quitar las gotas de la pared.
12. Sacar la placa del soporte magnético.
13. Agregar 12.5 µl de TE 0.1x a cada pocillo (sin multicanal). Sellar la placa, vortear 30-60 segundos



14. Dar un pulso, incubar 2 min y resuspender.
15. Colocar en el soporte magnético 5 min.
16. Transferir 10 µl y ponerlos en otra placa. *Nota: De uno en uno, importante NO arrastrar beads.*

**Se seleccionan fragmentos de ADN de aprox. 400 pb y mayores, y se descartan fragmentos más pequeños y enzimas y sales residuales.**

## VI. Indexación.

1. Sacar la placa NGSgo-Indx con los índices (-20°C) y dar un spin. Ponerla en hielo y quitar la pegatina solamente de los pocillos que se vayan a usar.

Registrar el número de placa de índices utilizada y lote en el libro de trabajo (I,II,III o IV) –ver figura al final del PR- y apuntar los pocillos usados para cada muestra. **Rotar periódicamente las placas de índices para evitar contaminación.**

2. Descongelar la mezcla HiFi PCR Mix, mezclar bien y mantener en frío.
3. Si solo se va a utilizar parcialmente la placa de índices:
  - a. Añadir 14 µl de la HiFi PCR Mix (tapón azul) en los pocillos que vayamos a usar.
  - b. Sellar la placa e incubar 3 min.
  - c. Vortear, dar un spin y transferir 12.5 µl a la placa con las muestras.
  - d. Sellar la placa, vortear, dar un spin y poner en el termociclador (**NGS-Indexación**)

		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		98°C	30 seg
10 ciclos	Desnaturalización	98°C	10 seg
	Alineación	65°C	30 seg
	Elongación	72°C	30 seg
Elongación final		72°C	5 min
Enfriamiento		15°C	∞

Punto seguro para parar

Mientras dura el termociclador (**NGS-Indexación**):

4. **Crear la lista de trabajo en el Illumina donde registramos qué índices corresponden a cada muestra:**
  - a. Local Run Manager / Create run / Generate FastQ
  - b. Nombrar la sesión: aammddX, siendo X la letra mayúscula del técnico que realiza el ensayo.
  - c. Librería Prep /GenDx kit HLA Panel
  - d. Teclear el nº de muestras de la sesión
  - e. Aparecerá la tabla en la que se va añadiendo la identificación de cada muestra leyendo su código de barras en el orden en el que figuran en el libro de trabajo.
  - f. A continuación ir seleccionando del desplegable los índices utilizados en el orden en que se han utilizado, primero los IN-7##-IL (índice 1) utilizados en esa sesión y luego los IN-5##-IL (índice 2) (ver figura al final del PR).

#### **VII. Pooling de librerías, purificación con beads 0.6x y selección de tamaños.**

5. Nada más salir de la PCR de indexación hacer el pooling de librerías mezclando 5 µl de cada muestra en un eppendorf.
6. Purificación con beads AMPure XP (TA):
  - a. Vortear las beads
  - b. Añadir el 60% del volumen total de la mezcla. Si hay 24 muestras → volumen final 120 µl →  $120 \times 0.6 = 72$  → 72 µl de beads. Vortear e incubar en el agitador 5 min.
  - c. Poner el tubo destapado en el soporte magnético
  - d. Incubar 5 min. Eliminar y descartar el sobrenadante.
  - e. Añadir 800 µl de etanol 80%, incubar 30 segundos. Eliminar y descartar el sobrenadante.
  - f. Repetir el paso e. una vez más.
  - g. Eliminar todo el etanol residual con la pipeta de 10 µl.
  - h. Dejar seco el pellet (5 min). Quitar las gotas de la pared.
  - i. Sacar el tubo del soporte magnético.
  - j. Agregar 66 µl de TE 0.1x al tubo. Vortear 30-60 segundos
  - k. Incubar 2 min en agitación.
  - l. Colocar en el soporte magnético 5 min.
  - m. Coger 60 µl y ponerlo en otro tubo. Este eluido es la librería final.

Conviene verificar el tamaño de los fragmentos de ADN de la librería mediante electroforesis en gel de agarosa. **Los fragmentos de ADN deben estar en el rango entre 400 bp y 1000 bp.** El tamaño de los insertos se puede verificar posteriormente en el NGSengine, en el gráfico "Insert size" en "Statistics".

Punto seguro para parar

### VIII: Cuantificación de la librería en Qubit, carga y secuenciación en MiniSeq.

- Preparar dos tubos para los dos estándares de ADN y uno para la librería.
- Preparar la solución de trabajo Qubit haciendo una dilución 1:200 del reactivo Qubit en el tampón Qubit de acuerdo con la tabla siguiente (preparar 200  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo para cada estándar de ADN y para la librería):

Tabla: Composición de la solución de trabajo Qubit

Componente	Volumen
Qubit Reagent	1 $\mu\text{l}$
Qubit Buffer	199 $\mu\text{l}$
<b>Volumen total</b>	<b>200 <math>\mu\text{l}</math></b>

- Preparar los tubos para Qubit de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla: Composición de los tubos para Qubit

Componente	Estándar AND	Muestra AND
Qubit Working Solution	190 $\mu\text{l}$	198 $\mu\text{l}$
ADN estándar (del kit)	10 $\mu\text{l}$	-
Muestra de AND	-	2 $\mu\text{l}$
<b>Volumen Total</b>	<b>200<math>\mu\text{l}</math></b>	<b>200<math>\mu\text{l}</math></b>

- Vortear los tubos durante 2-3 segundos e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz
  - Introducir los tubos en el fluorímetro Qubit y realizar las lecturas.
  - Pasar la concentración que se obtiene en el Qubit de  $\text{ng}/\mu\text{l}$  a  $1\text{nM}$ . Para ello usar el Excell **Cálculos Qubit Miniseq**: introducir los  $\text{ng}/\mu\text{l}$  que da la lectura del Qubit y el Excell te indica los  $\mu\text{l}$  que hay que mezclar de librería y TE para ajustar la librería a  $1\text{nM}$
7. Diluir NaOH 1/100 (99  $\mu\text{l}$  agua + 1  $\mu\text{l}$  NaOH).
  8. Mezclar 5  $\mu\text{l}$  de NaOH 1/100 y 5  $\mu\text{l}$  de la librería diluida a  $1\text{nM}$ .
  9. Resuspender con la pipeta e incubar 5 min a TA.

10. Agregar 5 µl de Tris-HCl 200mN pH7 para neutralizar el NaOH.
11. Parar la reacción con 985 µl de buffer Hyb. La librería queda a 5pM.
12. Invertir varias veces el tubo y mantenerlo en frío.
13. Diluir la librería a 1.5pM con buffer Hyb (350 µl buffer Hyb + 150 µl de la librería 5pM).
14. Invertir el tubo varias veces y dejar en frío.
15. Cargar la librería en el cartucho (“Mid Output Reagents Cartridge”) añadiendo 500 µl de librería (por la pared) en posición Load Library Here (en naranja) tras agujerear posición con una punta p1000

Para solución de problemas se recomienda consultar el documento externo “NGSgo®-MX6-1 Instrucciones de Uso” de GENDX.

### VIII. Secuenciación NGS en el MiniSeq.

Para la secuenciación en el MiniSeq, utilizar los reactivos de secuenciación “paired-end” de 300 ciclos (2x150) (“Mid Output Reagents Cartridge”). La capacidad del run NGSgo con las *flow cell* disponibles es:

<i>Flow cell</i>	Mix 6
<b>Mid</b>	<b>77 muestras</b>
<i>High</i>	233 muestras

Iniciar secuenciación (consultar el documento externo “MiniSeq™ System Guide” para detalles del proceso):

1. De la pantalla principal del software del Miniseq elegir Sequence > Local Run Manager
2. Seleccionar el run que hemos creado.
3. Quitar flow cell y cargar la nueva. Antes de cargarla verificar que ha sido lavada con etanol absoluto y secada con un pañuelo sin pelusas.
4. Sacar cartucho de lavado (gris) y cargar cartucho con librería
5. Desechar el contenido de la botella de residuos y volver a poner la botella en su sitio. Cerrar la puerta del compartimento.
6. El MiniSeq realizará un chequeo pre carrera (dura unos minutos). Cuando se active la tecla Start, pulsar y se iniciara la carrera.
7. Una vez finalizada la NGS, copiar los archivos Fastq en un USB. Identificar la sesión con la fecha de la misma (aammdd) seguida por la inicial del técnico que la ha realizado.

Nota: Información sobre el cartucho y la *flow cell* (lotes) utilizados se pueden consultar en la pestaña “Run Overview” del MiniSeq.

### IX: Análisis de secuencias con el software NGSengine.

Copiar los archivos FastQ en la carpeta RESULTADOS NGS.  
Entrar en el NGSengine (Primer Revisor). Seleccionar File>New Project e **identificar la sesión** como: aammddX\_lote

siendo: aammdd la fecha de la sesión NGS; X la inicial del técnico que ha realizado la sesión, y **lote el código de barras del lote NGSgo-MX6-1** (Kit amplificación).

Browse> RESULTADOS NGS>seleccionar Carpeta sesión > Next>Add Data folder> RESULTADOS NGS> seleccionar Carpeta sesión>Next>Start analysis now>Finish.

Siempre que el programa NGSengine dé un aviso de nueva versión del programa y base de datos IMGT, se actualizará dicha nueva versión descargándola del link de acceso y se validará su uso con respecto a la versión anterior con una muestra patrón.

Para detalles sobre el manejo del *software* NGSengine, consultar el documento externo “NGSengine®” de GENDX.

## **RESULTADOS**

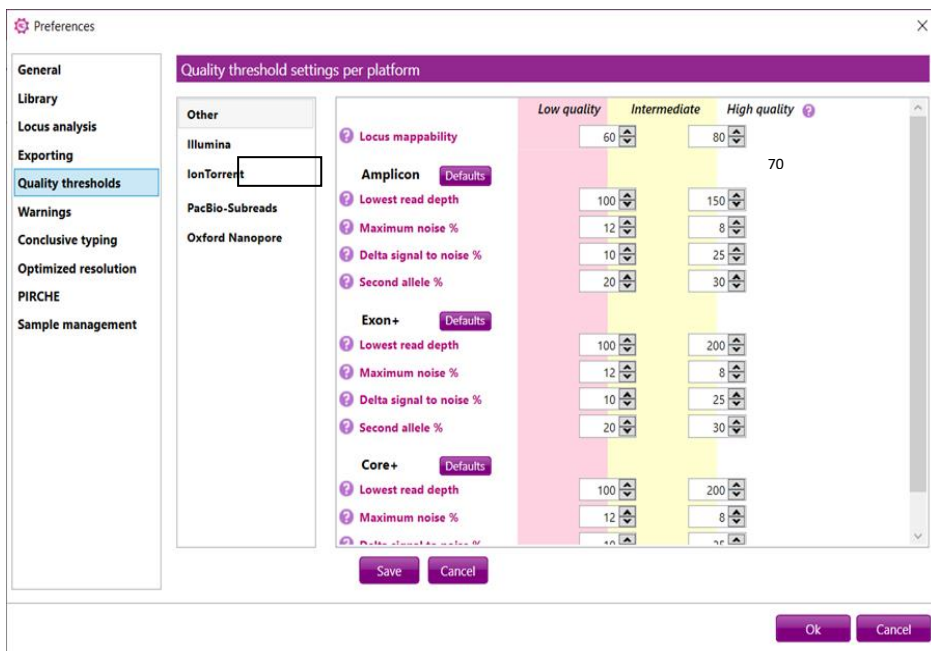
### **Criterios de aceptación:**

#### **1) Parámetros de calidad óptimos de la secuenciación NGS en el MiniSeq:**

Densidad de clusters: La densidad óptima de clusters en el MiniSeq con la concentración de librería utilizada es de 170-220 K/mm<sup>2</sup>. No obstante en caso de densidades mayores/ menores los datos también pueden analizarse en el NGSengine inspeccionando cuidadosamente los resultados de tipaje. Parámetros de calidad (Q): Un Q30 (probabilidad de error 0.001) > 80% y un porcentaje de clusters que pasan el filtro del 80% permiten obtener una profundidad de lectura suficiente en el análisis posterior en NGSengine.

#### **2) Parámetros de calidad de secuencias en NGSengine:**

Los *settings* de los parámetros se pueden ver en File>Preferences> **Quality threshold settings (umbrales de calidad)** y son los siguientes:



- Locus **mappability** (cantidad de lecturas de asignación de locus): el porcentaje de lecturas aceptadas de todas las lecturas asignadas al locus.
- **Lowest read depth** (Profundidad de lectura más baja): el número de lecturas en la posición con la profundidad de lectura más baja.
- **Maximum noise %** (máximo porcentaje de ruido): el porcentaje de ruido en la posición con el nivel de ruido más alto. Ruido significa errores de asignación de base que se produjeron durante la secuenciación.
- **Delta signal to noise %** (Señal delta a ruido%): la diferencia entre el ruido más alto y la posición heterocigótica más baja en %.
- **Second allele %** (% del segundo alelo): el porcentaje medio de las posiciones heterocigotas del alelo con la menor abundancia

**Settings utilizados para análisis de locus son:**

**Locus settings** (HLA-A)

**Locus:** HLA-A

**Amplicon:** NGSgo-MX6-1

**Analysis region:**  All  
 Exon+ region  
 Core+ region

**Ignore regions:**  Default  
 Custom

**Phasing algorithm:** Cluster

**Read depth threshold:** 20 (Default)

**Region avg. allele threshold %:** 20 (Default)

**Noise threshold %:** 14 (Default)

**Quality trimming:**  Apply trimmer

QV absolute threshold: 20 (None)

QV relative threshold (%): 70 (None)

Window size: 10

Defaults for: Illumina, Ion Torrent, PacBio

Buttons: Ok, Cancel

**Amplicón:** NGSgo-MX6-1 (al seleccionar el sistema de amplificación, el software excluye del análisis las regiones del primer de la amplificación NGSgo-MX6-1).

**Región de análisis:** Amplicon (puede ser modificada a región Core+ o región Exon+ cuando hayan mismatches en intrón y queremos asegurarnos que la secuencia core (exones 2 y 3 para clase I y exón 2 para clase II, no cambia)

**Regiones ignoradas:** Default (en algunos *loci* el software ignora por defecto determinadas regiones para el análisis por ser problemáticas, repetitivas, homopolímeros...)

**Algoritmo para el *phasing*:** por defecto “Cluster” para todos los loci salvo el DRB1, en que el algoritmo por defecto es “Classic”.

**Umbral de profundidad de lectura:** por defecto, las regiones con una profundidad de lectura inferior a 20 son excluidas del análisis. Bajando este umbral, estas regiones pueden ser incluidas en el análisis (solo modificar este *setting* tras analizar cuidadosamente los datos y bajo la supervisión del Supervisor/Facultativo Responsable).

**% medio del segundo alelo para cada región:** por defecto 20% para los loci A, B, C y DPB1, y 15% para DRB1 y DQB1. En caso de desequilibrio de alelos en un locus (se puede ver en el gráficos de “Variación de bases”, este umbral puede bajarse, teniendo en cuenta el umbral de ruido de fondo, que debe ser más bajo que el umbral del alelo (solo modificar este *setting* tras analizar cuidadosamente los datos y bajo la supervisión del Supervisor/Facultativo Responsable).

**% umbral de ruido de fondo:** Es el umbral por debajo del cual una base es considerada como ruido de fondo. Por defecto, 15% para A, B, C y 10% para DRB1, DQB1 y DPB1. Cuando en el gráfico de “Variación de bases” se ve con claridad que el segundo alelo está por debajo del 20/15% y hay una clara distancia con el ruido de fondo, es posible bajar el umbral de ruido de fondo (solo modificar este *setting* tras analizar cuidadosamente los datos y bajo la supervisión del Supervisor/Facultativo Responsable).

**Quality trimming:** Filtra las lecturas de baja calidad y elimina los extremos de baja calidad de las lecturas. El valor de la calidad de un nucleótido (QV) para todas las lecturas se puede ver en el gráfico “QV en lecturas”. Por defecto estos valores son:

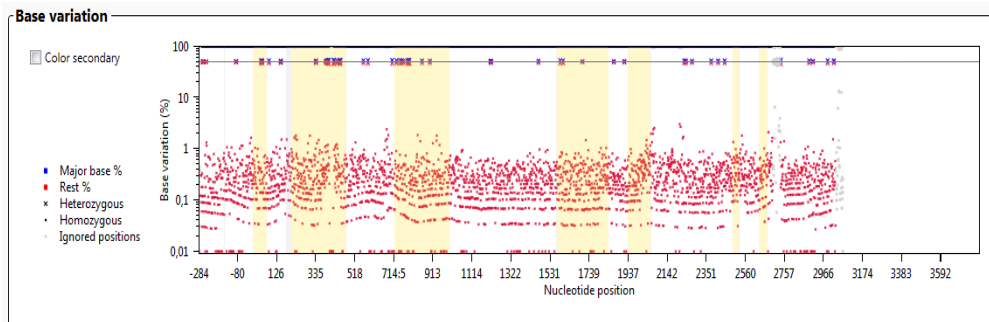
Umbral QV absoluto: 20 (eliminará la lectura que empiece por una posición con una QV inferior a 20)

Umbral QV relativo (%): 70 (umbral en relación a la máxima QV de cada lectura)

Tamaño de ventana: 10 (para cada posición se calcula la QV de esa posición y las 9 siguientes).

### **Revisión de parámetros de calidad de secuencia:**

1. Para cada muestra, y cada locus, visualizar el **gráfico de “Variación de base”** para hacer una inspección visual de la distribución de % de bases en las posiciones heterocigotas y la señal delta al ruido de fondo.



2. Revisar la **Métrica de calidad** para cada muestra y cada locus, entrando en “Quality metrics” y seleccionando Core+ and Exon+.



Resolution: All fields		Quality metrics: All combined																			
Locus	Map	Region	LRD	#HP	Noise	ΔSN	ESA	MM	?	IMGT	BMG										
Sample11-A-B-C-DR-DQ												87693/100000 (87%)		✓	✗	Reanalyze					
HLA-A	96%	Core++	758	0	5.5%	-	-	0	3,29,0	4	i	A*02:01:01:01, A*02:01:01:01	[R] 1	✓	✗	Reanalyze					
		Evan++	393	0	5.5%	-	-	0								Reanalyze					
		Amplicon	342	0	5.5%	-	-	0								Reanalyze					
HLA-B	97%	Core++	603	25	8.1%	43%	48%	0	3,29,0	1		B*07:03, B*15:01:01:01	[R] 1	✓	✗	Reanalyze					
		Evan++	603	37	8.1%	43%	48%	0								Reanalyze					
		Amplicon	446	97	8.1%	42%	48%	0								Reanalyze					
HLA-C	97%	Core++	497	1	5.8%	48%	49%	0	3,29,0	2		C*03:03:01:01, C*03:04:01:01	[R] 2	✓	✗	Reanalyze					
		Evan++	457	1	5.8%	48%	49%	0								Reanalyze					
		Amplicon	167	2	5.8%	48%	48%	0								Reanalyze					
DRB1	92%	Core++	759	19	2.1%	41%	43%	0	3,29,0	10	i	DRB1*13:01:01:01, DRB1*15:01:01:01 <sup>DRB35</sup>	[R] 2	✓	✗	Reanalyze					
		Evan++	759	28	2.1%	41%	45%	0								Reanalyze					
		Amplicon	551	68	2.1%	41%	48%	1								Reanalyze					
DQB1	97%	Core++	484	3	1.5%	47%	47%	0	3,29,0	2		DQB1*06:02:01:01, DQB1*06:03:01:01	[R] 2	✓	✗	Reanalyze					
		Evan++	383	3	1.5%	47%	47%	0								Reanalyze					
		Amplicon	227	4	13.7%	42%	47%	0								Reanalyze					

- Map **Mappability**: porcentaje de lecturas que podrían alinearse con la referencia.
- LRD **Lowest read depth**: Profundidad de lectura más baja: el número de lecturas en la posición con la profundidad de lectura más baja.
- #HP **Heterozygous positions**: Número de posiciones heterocigotas
- Noise **Maximum noise %**: Porcentaje del ruido en la posición con el nivel de ruido más alto.
- ΔSN **Delta signal to noise %**: Diferencia entre el nivel de ruido más alto y la posición heterocigota más baja.
- ESA **Second allele %**: Porcentaje medio del 2º alelo (el menos abundante)
  1. Visualizar el **phasing**
  2. Revisar las **posiciones con ?** y editarlas si la modificación es clara.
  3. Revisar los **mismatches**
  4. Revisar cuidadosamente todos los parámetros en caso de **secuencias homocigotas**.

Ocasionalmente, **HLA-Y** puede coamplificar con los siguientes alelos HLA-A: A\*30:01, \*33:01, \*33:03, \*68:02, \*29:01, \*02:03 y \*02:05. En el caso de que las lecturas de HLA-Y puedan interferir con las lecturas de HLA-A y el nivel de ruido sea demasiado alto, los datos pueden ser reanalizados incluyendo HLA-Y como un gen en el análisis. En Overview>Sample settings>Add locus>seleccionar HLA-Y>reanalizar

### **Criterios de rechazo:**

Si el control negativo de la amplificación o, cuando procedan, los controles del *wipe-test*, salen positivos, se anulará la sesión y se procederá según el PR-HLA-40: Detección de contaminación por ADN en el laboratorio.

Si la amplificación de alguna muestra ha sido negativa, eliminar esa muestra de la sesión y proseguir con el resto.

No se aceptará como válida ninguna muestra en la que:

23. la métrica de calidad tenga la mayoría de parámetros de calidad en rojo o amarillo;

24. los tamaños de todos los insertos sean inferiores a 300 pb;
25. haya un número considerable de lecturas de baja calidad;
26. haya un número elevado de *mismatches* en exón.

### **Aprobación/rechazo de las muestras:**

Primer revisor: Finalizada la revisión, el primer revisor puede aceptar o rechazar el resultado de un locus o de una muestra haciendo clic en el icono de aceptar o rechazar.

Segundo revisor: El segundo revisor (Supervisor/Facultativo responsable) inspeccionará los datos por locus/muestra y aceptará o rechazará definitivamente el resultado de una muestra/locus. También es posible que el revisor cree una copia de revisión para volver a analizar una muestra con diferentes configuraciones sin afectar el análisis original. Puede crear una copia de revisión haciendo clic con el botón derecho del ratón detrás del nombre del locus y luego seleccionar "Revisar". Se agregará una copia del locus. Los resultados del análisis de la copia no aparecerán en el informe, a menos que se apruebe o rechace". Para continuar, hacer clic en "Aceptar". Esto dará como resultado una copia del locus, resaltado en naranja, en la fila a continuación.

Si la muestra es rechazada, el segundo revisor dará las indicaciones oportunas para realizar las comprobaciones que estime necesarias.

En el caso de muestras para trasplante (pacientes en búsqueda o donantes preseleccionados para trasplante) en que algún locus (secuenciado parcialmente, por ejemplo DQB1) incluya un alelo nulo (por ejemplo, DQB1\*02:163N ambiguo con DQB1\*02:01:01:01 ó DQB1\*03:276N, ambiguo con DQB1\*03:01:01:01), se realizará la NGS del gen completo para descartar el alelo nulo.

Una vez el tipaje haya sido aprobado por el 2º Revisor (Supervisor/Facultativo responsable), se procederá con la transmisión on line de resultados a Hematos: File>Custom export>ATOS.

Desde Hematos se importarán los resultados: Online DLongwood HLA (NGS) Finalmente, el Facultativo responsable con acceso autorizado al programa Hematos será el encargado de validar los resultados en Hematos para que el informe de Histocompatibilidad se encuentre disponible en la red a los Centros Hospitalarios de la Generalitat Valenciana debidamente autorizados.

### **Copias de seguridad**

Como mínimo cada 3 meses, se realizará un back-up de los archivos FastQ del MiniSeq y de los Proyectos de la carpeta "RESULTADOS NGS" del ordenador del NGSengine, a un disco externo.

### **DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS**

Documento externo "NGSengine" de GENDX.

Documento externo “NGSgo-MX6-1<sup>®</sup>” Instrucciones de Uso” de GENDX.  
Documento externo: “MiniSeq™ System Guide”  
PR-HLA-19: Electroforesis  
PR-HLA-40: Detección de contaminación por ADN en el laboratorio

## APÉNDICE A. CONTROL DE CONTAMINACIÓN

Es importante incluir un control negativo que no tenga ADN molde cada vez que se haga una PCR para detectar una posible contaminación.

Separar las áreas de trabajo pre-PCR (manipulación de ADN inicial, preparación de la mezcla de amplificación de PCR) y post-PCR (desde la PCR y pasos posteriores).

Usar un juego de pipetas (con filtro) diferente para pasos pre-PCR y post-PCR.

Se recomienda usar H<sub>2</sub>O libre de nucleasas nueva, como la incluida en el kit.

Limpiar con lejía bancadas de laboratorio, aparatos y pipetas.

Evitar la contaminación de los índices: no intercambiar los tapones/tapas de los tubos NGSgo-IndX. Rotar periódicamente las placas de índices.

## CICLOS DE AMPLIFICACIÓN DE CADA TÉCNICA DE TIPAJE

Los ciclos de amplificación se realizaron según indicaciones del fabricante

Tipaje HLA- SSO (Rafer)									
Paso	1		2		3			4	5
T <sup>a</sup> (°C)	96	96	60	72	96	60	72	72	4
Tiempo	3'	20"	20"	20"	10"	15"	20"	10'	∞
Nº ciclos	1		5		30			1	

Tipaje HLA- SSO (Longwood)									
Paso	1		2		3			4	5
T <sup>a</sup> (°C)	95	95	60	72	95	63	72	72	4
Tiempo	3'	15"	30"	30"	10"	30"	30"	2'	∞
Nº ciclos	1		12		28			1	

Tipaje HLA- SSP							
Paso	1	2		3			4
T <sup>a</sup> (°C)	94	94	65	94	61	72	4
Tiempo	2'	10"	1'	10"	50"	30"	∞
Nº ciclos	1	10		20			1

Tipaje HLA-NGS. 1º amplificación						
Paso	1	2		3	4	
T <sup>a</sup> (°C)	95	95	65	68	68	15
Tiempo	3	15	30	5	10	∞
Nº ciclos	1	25		1		

Lo que ocurre en cada uno de los pasos se expone a continuación: paso 1) se produce la desnaturalización inicial; paso 2) ocurre, en el siguiente orden, desnaturalización, alineamiento y elongación; paso 3) elongación final y paso 4 enfriamiento.

Tras la primera amplificación el siguiente paso es la fragmentación del ADN. La cantidad de producto amplificado debía estar en el rango 50-1000 ng (óptimo 250 ng) y las condiciones del termociclador se detallan a continuación:

Tipaje HLA-NGS. 2º fragmentación			
Tª (°C)	25	70	15
Tiempo	20'	10'	∞
Nº ciclos	1		

Después prosigue la ligación:

Ligación de adaptadores: permiten la hibridación de las moléculas que se desean secuenciar a la superficie de la Flow cell.

Tipaje HLA-NGS. 3º ligación		
Tª (°C)	20	15
Tiempo	15'	∞
Nº ciclos	1	

Luego se continúa con la ligación de índices: permiten la identificación de cada muestra dentro de un grupo de muestras que se han secuenciado a la vez

Tipaje HLA-NGS. 4º indexación						
Paso	1	2		3	4	
Tª (°C)	98	98	65	72	72	15
Tiempo	30"	10"	30"	30"	5'	∞
Nº ciclos	1	10		1		

Se verificó el tamaño de los fragmentos de ADN de la librería mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN debían estar en el rango entre 400 bp y 1000 bp. Cuantificación de la librería en Qubit y tras la indexación prosigue la amplificación sobre la fase sólida de la Flow cell

Tipaje HLA-NGS. 5º Seq-gendx					
Paso	1	2		3	
Tª (°C)	96	96	50	60	15
Tiempo	10"	10"	10"	2'	∞
Nº ciclos	1	25			

Amplificación de segundo nivel para amplificar exones exosap: enzimas para limpiar lo que se ha degradado.

Tipaje HLA-SBT segundo nivel exosap			
	1	2	3
T <sup>a</sup> (°C)	37	80	4
Tiempo	15'	15''	∞
Nº ciclos	1	1????	

Tipaje KIR- SSO									
Paso	1		2		3			4	5
T <sup>a</sup> (°C)	96	96	60	72	96	60	72	72	4
Tiempo	3'	20''	20''	20''	10''	15''	20''	10'	∞
Nº ciclos	1	5		30			1	1	

Tipaje KIR- SSP					
	1	2			3
T <sup>a</sup> (°C)	95	94	63	72	4
Tiempo	1'	20''	20''	1'30''	∞
Nº ciclos	1	30			1

## ANEXO X. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA



### DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AC HLA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Código		Realizado	Aprobado
PR-HLA-15		Fdo: Facultativo	
Edición	Fecha emisión		
02	08/10/2021		

#### **1. OBJETO**

Detección e identificación de anticuerpos HLA con la posibilidad de diferenciar anticuerpos de clase I y clase II.

Detección de anticuerpos anti-HLA fijadores de complemento, en pacientes con anticuerpos positivos detectados previamente.

#### **2. MATERIALES Y EQUIPOS**

Citómetro de flujo Luminex

Alcohol 70%.

Lejía

Agua destilada

Tampón de lavado 1X

Solución de revelado

Placas de 96 pocillos de fondo en U

Pipeta automática de 0.5-10 µL; de 10-100 µL; 100-1000µL

Pipeta multicanal de 0.5- 10 µL y 30-200 µL

Reactivos necesarios de cada Kit que incluirán microesferas con antígenos (mezcla, aislados o con C1q).

## **2.1 Instrucciones de almacenamiento de los reactivos**

Todo el kit se envía sobre hielo seco y deberá almacenarse en congelador a -65°C o por debajo hasta el primer uso o hasta la fecha de caducidad.

Complemento humano C1q: Después de descongelar, almacenar a -20°C

Anti-C1q conjugado con PE y microesferas de control positivo C1qScreen™: Después de descongelar, almacenar a 2-8°C. No volver a congelar. Proteger de la luz.

Tampón HEPES: Después de descongelar, almacenar a 2-8°C. No volver a congelar.

## **3.MÉTODO**

### **3.1 Personal**

Personal Técnico del Laboratorio de Histocompatibilidad (HLA)

## **4. DEFINICIONES:**

Las técnicas que se pueden utilizar son:

**Técnica detección de anticuerpos (LSM12):** es una técnica con microesferas que detecta simultáneamente anticuerpos de clase I y Clase II.

**Técnica identificación anticuerpos clase I y clase II (Single Antigen):** En este escrutinio las microesferas a las que se enfrenta el suero llevan solo un antígeno en su superficie, por lo que permite saber todos los antígenos que



reconoce el anticuerpo y valorar la intensidad de fluorescencia de cada especificidad del anticuerpo.

**Técnica identificación de anticuerpos clase I y II fijadores de complemento (Single Antigen+C1q):** En este escrutinio los *beads* a los que se enfrenta el suero llevan solo un antígeno. A estas microesferas se añade el reactivo C1q para distinguir los anticuerpos fijadores de complemento en su superficie.

### Soluciones:

**Tampón de lavado 1X** (1 parte de tampón y 9 de agua): Diluid tampón de lavado (WASH BUFFER) 10x en agua destilada, para obtener un tampón de lavado 1X.

**Conjugado:** contiene 1  $\mu$ L de antiglobulina humana conjugada con el colorante ficoeritrina y 99  $\mu$ L de tampón de lavado. El volumen de antiglobulina humana a preparar es el número de muestras a analizar más cinco y completar con la cantidad correspondiente de tampón de lavado. En el tubo que contenga la solución de revelado se ha de apuntar el volumen preparado y debe quedar protegido de la luz hasta su dispensación.

## **5. DESARROLLO**

### **5.1 Conexión del Citómetro:**

Para la puesta en marcha del Citómetro seguid el orden siguiente:

- 4) Encended el equipo. Tarda 35' en calentar.

En la pestaña System Login al escribir User ID y contraseña, se abrirá la página Home.

- 5) Abrid la página Maintenance (Mantenimiento) y, luego, la pestaña Cmds & Routines (Instrucciones y rutinas).
- 6) Seleccionad Arranque
- 7) Lavad el equipo:
  - a. PRIME
  - b. ALCOHOL FLUSH
  - c. WASH 3 lavados con líquido (Solución de lavado)

Nota: El sistema de fluidos debe estar siempre conectado. Comprobad que haya fluidos de sistema en la garrafa y el nivel de la de desechos.

## **5.2 Realización de la técnica en placa de 96 pocillos:**

En primer lugar se tratarán todos los sueros, objeto de estudio, con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) cuyo objetivo es eliminar la interferencia que el posible fenómeno prozona mediado por complemento podría ocasionar en la detección/identificación de anticuerpos anti-HLA. Para ello se necesita:

### **PREPARACIÓN EDTA AL 0,6%**

5mL de EDTA 500mM+7,15 mL de NaCl 0,9%= 12,15 mL de EDTA al 0,6% (Alicuotar en 10-12 tubos de 1mL. Congelar a -20°C hasta 12 meses)

### **TRATAMIENTO DE LOS SUEROS CON EDTA AL 0,6%**

En cada eppendorf se añaden 12 µL EDTA a 0.6% y, posteriormente, 12,5 µL del suero del paciente correspondiente. La mezcla se deja incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Tras la realización de este pretratamiento de los sueros se procede a desarrollar la técnica

### **Técnica de detección o identificación anticuerpos clase I y clase II:**

1. Marcad en la placa con un rotulador los pocillos que van a usarse en la técnica, siguiendo un orden que va por filas de arriba a abajo. (Ejemplo, A1, B1, C1, D1, etc.)
2. Centrifugad los sueros problema y el control negativo 10 minutos a 10000g.
3. Vortead 10 segundos las microesferas específicas de cada técnica LABScreen.

4. Dispensad en cada pocillo de la placa: en primer lugar 5  $\mu$ L de microesferas del LABScreen; a continuación se añaden 20  $\mu$ L del suero de cada paciente en su pocillo correspondiente.

5. Sellad la placa y agitad suavemente en una plataforma rotatoria durante 30 segundos.

6. Incubad 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente ( $23\pm 4^{\circ}\text{C}$ ). (Preparad la solución tampón, ver apartado de “definiciones”).

-----*En este tiempo de espera se introduce la sesión en el ordenador (apartado 5.3)*-----

7. Vortead nuevamente 10 segundos y añadir 100  $\mu$ L de tampón de lavado en cada pocillo.

8. Sellad la placa y centrifugar a 2540 r.p.m durante 5 minutos.

9. Decantad y repetid el lavado 2 veces, añadiendo en cada lavado 100  $\mu$ L de tampón de lavado en cada pocillo (Durante los lavados preparad la solución de revelado, ver apartado de “definiciones”).

10. Después del último lavado decantad y secad sobre paño limpio.

11. Añadid 100  $\mu$ L del conjugado a cada pocillo.

12. Incubad durante 30 minutos en oscuridad, en agitación suave, en la plataforma rotatoria.

13. Centrifugad a 2540 r.p.m durante 5 minutos y decantar. A continuación, repetid el lavado añadiendo 100  $\mu$ L de tampón de lavado.

14. Después del último lavado se añaden 70  $\mu$ L de tampón de lavado. Agitad 10 segundos suavemente.

15. Proceded a la lectura en el Luminex. (Proteged de la luz si no se lee inmediatamente).

### **Técnica de identificación anticuerpos clase I y clase II fijadores de complemento**

1) Inactivar los sueros que van a ser analizados de la siguiente forma:

a) Dispensar 40 $\mu$ L de cada suero en tubos eppendorf de 1,5 mL.

b) Calentar los tubos durante 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ .

c) Centrifugar los tubos a 8000 rpm durante 10 min.

d) Transferir 30µL del sobrenadante a otros tubos y colocarlos en hielo.

2) Mientras se inactivan los sueros, diluir el reactivo C1q a 1:5 con HEPES según el siguiente ejemplo atendiendo al número de muestras:

Muestras	Reactivo C1q	Tampón HEPES	Volumen Total
1	1 µL	4 µL	5 µL
2	2 µL	8 µL	10 µL
5	5 µL	20 µL	25 µL
25	25 µL	100 µL	125 µL

(Preparar la cantidad adecuada para nº de muestras + 1).

Tras la dilución vortear bien y colocar la dilución en hielo hasta que se utilice.

3) En placa de 96 pocillos fondo en U, dispensar en el pocillo de cada muestra: 5 µL de reactivo C1q previamente diluido + 5 µL del suero inactivado.

Vortear suavemente para que se mezclen bien.

4) Añadir a cada pocillo 3-5 µL de los *beads del single antigen* más 0,5 µL de los *beads control positivo* que se incluyen en el kit de C1q.

5) Sellar la placa y vortear suavemente unos 10 segundos. Colocar la placa en un agitador horizontal e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

6) Añadir a cada pocillo 5 µL del conjugado anti-C1q marcado con PE.

7) Sellar la placa y vortear suavemente 10 seg. Colocar la placa en el agitador horizontal protegida de la luz durante 20 minutos a temperatura ambiente.

8) Dispensar 80 µL de tampón de lavado (solución de lavado LSM12), sellar, vortear y centrifugar la placa a 1300 g durante 5 minutos (programa 4 de la centrífuga eppendorf 5810R). Eliminar el sobrenadante mediante un “flick”.

9) Volver a dispensar 80 µL de tampón lavado, sellar y vortear. Las muestras están preparadas para su lectura en el Luminex al que previamente se le habrán realizado las pautas de mantenimiento.

### **5.3 Introducción de la sesión en el ordenador**

#### **5.3.1 Introducción de sesión de LSM12 en programa HLA-Inmuno**

Si el ordenador está apagado, al abrirlo el usuario es uctval\_hla y la contraseña placa2009

Id a **Aplicaciones de equipo** y seleccionar sucesivamente → Programa **HLA-Inmuno** → en el menú escoged **Laboratorio:Citotóxicos** → **Gestión de sueros** → **Marcar todos** → **Exportación a Fusion** → **Generar archivos** → **OK**

Una vez introducida la sesión de LSM12 en el programa HLA-Inmuno habría que generar la lista de sueros en el programa del citómetro Xponent

#### **5.3.2 Cómo crear la lista:**

En el escritorio hay una carpeta de almacenamiento llamada “**LISTA**”.

Poner primero el control negativo. Después se pasa cada tubo por el lector del código de barras y se comprueba que se van añadiendo al listado. Cuando están todos leídos el modo de guardarlos es **File** → **Save as** → se le da nombre LSM12 y la fecha correspondiente a la realización de la prueba → **Guardar** en Escritorio (**Desktop**)

#### **5.3.3 Cómo crear batches:**

Las opciones de la pestaña **Batches** (Lotes) en la página **Batches** son:  
PAG 27

- Create a New Batch from an existing Protocol (Crea un nuevo lote a partir de un protocolo existente)
- Create a New Multi-Batch (Crea un nuevo multilote)

### **Creación de un nuevo lote a partir de un protocolo existente:**

1. Abrid la página **Batches** (Lotes).
2. Seleccionad **Create a New Batch from an existing Protocol**
3. Escoged el protocolo que se desea usar en la lista **Select a Protocol**.
4. Escribid el nombre del lote con la fecha en la que se ha montado la técnica en la casilla **Batch Name**. Ejemplo: LSM12\_020\_170326. Primero figura el template o técnica realizada, después la fecha de la sesión y el lote utilizado.
5. Pulsad **Next**. Si el protocolo usa patrones, controles, o ambos, la siguiente pestaña que se abre es la pestaña **Stds & Ctrl**s (Patrones y controles).

En el dibujo esquemático de la placa se seleccionan los pocillos que se van a analizar y se escoge la U amarilla de Unknown.

Posteriormente se importa la lista, preparada en el escritorio (Desktop) del ordenador. Se selecciona y se guarda.

Del mismo modo se crearía el batch de los Singles.

6. **Save** para guardar la información del lote en la lista **Pending Batch** (Lote pendiente) que se ejecutará posteriormente.

### **5.4 Adquisición de datos:**

1. Introducid la placa para su lectura y seleccionad la pestaña de **Batches** (ahí se ha de seleccionar el Batch que se quiere analizar)→ **Run** (el

programa realizará una pregunta ratificando el Batch y si está correcto escoger → **Yes**

2. Al terminar la lectura se debe seleccionar la pestaña **Maintenance** → **Comds and Routines** → en el desplegable escoger **Weekly Maintenance (Luminex)** → **Run**
3. Cuando finalice el mantenimiento semanal, seleccionar en el desplegable la rutina llamada **Parada** (que supondrá la finalización del proceso). Se requiere vaciar el contenido líquido de las cubetas con los restos de agua, lejía y alcohol.

### 5.5 Importación de resultados:

#### **Importar en Fusion:**

7. Abrid el programa FUSION y pulsar sobre el icono de la Inmunoglobulina. En el lado izquierdo aparecerán las sesiones que se han pasado por el citómetro pero están pendientes de ser analizadas.
8. Pulsad sobre la sesión que queremos analizar, aparece el listado de muestras. Seleccionad la opción **Samples** → **Import Sample List** → **“Search Sample list HLA”** → **Comunicación Fusion Inmuno** (seleccionar fecha del montaje de la técnica) → FUS\_SUEROS+fecha del montaje → **Open**
9. Buscad la lista a cargar en la localización en red (**Search**) → **Comunicación HLA-Fusion**, y en el desplegable **ListFormat** seleccionar → **Simple List (csv)**
10. En **List ID** Poned nombre a la lista (nombrarla con el mismo formato que el batch)
11. Seleccionad todas las muestras
12. **Import List** → A continuación se abrirá la siguiente ventana de diálogo indicando **“Sample import is completed”** , seleccionad → **OK** → **Close**.

\*En este punto, se ha importado a Fusion la información de Patien ID asociada al nº de muestra, así como un código que permite la posterior comunicación con el HLA Inmuno

En Fusion → Volver al listado de la izquierda, seleccionar la sesión, completar las fechas y nombres (el nombre del paciente en el campo “First Name” y los apellidos en “Last Name”), comprobar el control negativo.

ATENCIÓN:

- Si es LSM12 marcar **NS** (control negativo)→ **check control**→**close**→**Import**. Analizar abriendo el listado del navegador. Este modo sería si el control negativo ha salido correcto, si por el contrario tiene cuentas muy altas habría que seleccionar el control interno del aparato, es decir OLINS

- Si es Single→ **Default NS**→**OLINS**)→ **check control**→**close**→**Import**.

13. Tras seleccionar **Import**. Observar que la sesión pasa al Navegador en el lado derecho.

## **6. RESULTADOS**

Para poder analizar los resultados en el programa FUSION hay que ir a → **Utilities**→ **Switch Database**→ **Database Name: CTCV\_ Sero\_400**→ **OK**

Al entrar en Fusion en Test Date (salen en azul las que están sin analizar). Una vez estudiada la muestra escoger **Print Screen** para imprimir la gráfica y **Save** (guardar)

Para abrir la sesión a analizar, haced doble clic sobre la misma.

En pantalla aparece el sumario donde figuran todas las muestras. Ordenarlas y empezar a analizar haciendo doble clic sobre cada una de ellas.

Tras analizar la sesión habrá que confirmarla.

### **6.1 Análisis de resultados de la técnica LSM12 (Escrutinio de clase I y II):**

Cuando de positivo alguno de los tres resultados: clase I, clase II o el MICA, hay que poner el cursor sobre la columna de los *beads* positivos y comprobar las cuentas de fluorescencia que da (FMI) .Se considera positivo cuando la fluorescencia de alguna de las beads sobrepasa el 1500 FMI.

Corregid si fuera necesario el punto de corte, subiéndolo o bajándolo según el caso.



Aceptad el resultado con el botón "**Save**".

Imprimid el sumario.

## **6.2 Análisis de resultados de la técnica SINGLE ANTIGEN (Identificación de anticuerpos clase I y II):**

Para saber la importancia inmunológica del anticuerpo en vista a un posible trasplante o valorar un posible rechazo, se pica en *Raw* (pestaña inferior derecha), después en la pestaña *SFI (Raw)* de la parte superior derecha dos veces hasta que se ordenen los anticuerpos de máxima fluorescencia a mínima. Imprimir el histograma

Se considera positivo cuando la fluorescencia de algún *bead* sobrepasa 1500 FMI.

## **6.3 Criterio de valoración de los controles:**

El control negativo debe ser inferior a 500.

El control positivo debe ser superior a 1000.

El ratio debe ser superior a 10.


Para valorar los resultados positivo, se considera positivo cuando la fluorescencia de alguna de las *beads* sobrepase 1500 FMI.

## **6.4 Emisión de informes:**

Los resultados se introducen en el HEMATOS, con el código de prueba correspondiente y tras ser validados, se imprimen por conversión a un pdf. Los hospitales y usuarios del CTCV podrán acceder a estos datos a través de la página web del laboratorio CTCV. El resultado de la prueba de Single Antigen se puede también informar en papel directamente desde el programa Fusion.

## **7. IMPORTAR RESULTADOS DE FUSION AL PROGRAMA HLA INMUNO:**

Para entrar en el programa HLA-Inmuno el usuario es: uctval\_hla y la contraseña placa 2009

Después vamos a: **Laboratorio** → **Resultados de sueros desde Fusion** → Escoger el dibujo de carpeta c  hivo

Dentro de la carpeta se debe buscar la sesión de la que queremos pasar los resultados, que generalmente será la última que aparezca. Una vez seleccionada la sesión pulsad → **Abrir** → Además al lado de la carpeta hay un desplegable con dos opciones **“Resultados”** opción que hay que escoger para importar resultados de LSM MIX y **“Detección”** opción que hay que seleccionar en caso de importar resultados de Singles. Atención: Antes de procesar seleccionad la opción de: **Validar automáticamente** → **Procesar** → **Grabar resultados**.

Comprobad, cogiendo pacientes de la sesión al azar, que han pasado correctamente.

## **8. CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO:**

Se realizará con una periodicidad mensual.

## **9. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y RELACIONADOS:**

Documento Externo Controlado: Manual de la Citómetro Labscreen.

Documento Externo Controlado: Guía rápida manejo del Luminex. (LabScan 3D)

Documento Externo Controlado: Guía rápida XPonent®.

**10. REGISTROS:**

Código	Responsable	Plazo	Soporte	Codificación	Lugar archivo
Programa FUSION	Técnicos HLA	mensual	Informático	Copia de seguridad	Lab HLA
Programa HLA- Inmuno	Técnicos HLA	mensual	Informático	Copia de seguridad	Lab HLA
Sumario LSM12	Técnicos HLA	3 años	Papel	Número de registro	Lab HLA
Histograma SINGLE	Técnicos HLA	3 años	Papel	Número de registro	Lab HLA

## ANEXO XI. VARIABLES ESTUDIADAS EN EL ANÁLISIS UNIVARIABLE

### Análisis univariante EICR aguda grado I-IV

Variables	EICR aguda grado I-IV								p value
	20 días	40 días	60 días	80 días	100 días	120 días	140 días		
	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	
<b>Edad receptor, años</b>									
≤39años	9,52 (1,54-26,61)	29,63 (11,64-50,26)	34,66 (14,94-55,40)	49,74 (26,07-69,57)	49,74 (26,07-69,57)	49,74 (26,07-69,57)	49,74 (26,07-69,57)	49,74 (26,07-69,57)	0,809
40-59 años	7,83 (1,97-19,15)	31,53 (17,50-46,57)	50,10 (33,11-64,92)	53,22 (35,74-67,93)	53,22 (35,74-67,93)	53,22 (35,74-67,93)	53,22 (35,74-67,93)	53,22 (35,74-67,93)	
>60 años	3,89 (0,70-11,90)	36,32 (23,09-49,66)	44,53 (30,23-57,87)	53,11 (37,96-66,14)	55,34 (40,01-68,24)	55,34 (40,01-68,24)	60,06 (44,34-72,64)	60,06 (44,34-72,64)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>									
≤59 años	8,45 (3,08-17,30)	30,85 (19,47-42,96)	44,74 (31,57-57,06)	52,36 (38,45-64,53)	52,36 (38,45-64,53)	52,36 (38,45-64,53)	52,36 (38,45-64,53)	52,36 (38,45-64,53)	0,626
≥60 años	3,89 (0,70-11,90)	36,32 (23,09-49,66)	44,53 (30,23-57,87)	53,11 (37,96-66,14)	55,34 (40,01-68,24)	55,34 (40,01-68,24)	60,06 (44,34-72,64)	60,06 (44,34-72,64)	
<b>Sexo receptor</b>									
Mujer	6,25 (1,60-15,57)	33,91 (20,78-47,51)	40,31 (26,20-53,99)	44,73 (30,04-58,38)	44,73 (30,04-58,38)	44,73 (30,04-58,38)	44,73 (30,04-58,38)	44,73 (30,04-58,38)	0,297
Varón	6,40 (2,04-14,36)	32,86 (21,37-44,81)	48,02 (34,82-60,04)	58,77 (44,89-70,28)	60,65 (46,68-72,02)	60,65 (46,68-72,02)	62,62 (48,54-73,85)	62,62 (48,54-73,85)	
<b>Enfermedad de base</b>									
LA+Patología									
Mielóide	6,55 (2,40-13,62)	31,04 (20,80-41,79)	39,35 (28,12-50,37)	48,17 (36,11-59,23)	49,70 (37,52-60,73)	49,70 (37,52-60,73)	49,70 (37,52-60,73)	49,70 (37,52-60,73)	0,273
Patología linfóide+otros	5,88 (1,02-17,38)	38,24 (22,04-54,27)	55,88 (37,37-70,89)	62,19 (43,10-76,48)	62,19 (43,10-76,48)	62,19 (43,10-76,48)	62,19 (43,10-76,48)	62,19 (43,10-76,48)	
<b>LMA vs. resto</b>									
LMA	2,86 (0,21-12,89)	24,63 (11,40-40,49)	34,05 (18,29-50,50)	40,33 (23,28-56,80)	43,47 (25,87-59,85)	43,47 (25,87-59,85)	43,47 (25,87-59,85)	43,47 (25,87-59,85)	0,100
Distinto de LMA	7,86 (3,18-15,32)	37,18 (26,32-48,04)	49,25 (37,42-60,03)	58,05 (45,74-68,52)	58,05 (45,74-68,52)	58,05 (45,74-68,52)	59,83 (47,35-70,26)	59,83 (47,35-70,26)	
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>									
Estadio precoz	7,09 (1,80-17,49)	35,68 (21,49-50,11)	47,59 (31,76-61,83)	52,58 (36,23-66,57)	55,22 (38,59-69,04)	55,22 (38,59-69,04)	55,22 (38,59-69,04)	55,22 (38,59-69,04)	0,478
Estadio intermedio	7,55 (2,39-16,73)	36,72 (23,71-49,79)	46,60 (32,40-59,62)	57,26 (42,10-69,82)	57,26 (42,10-69,82)	57,26 (42,10-69,82)	57,26 (42,10-69,82)	57,26 (42,10-69,82)	
Estadio avanzado	0,00 (NaN-NaN)	13,85 (2,04-36,62)	28,21 (8,10-52,88)	36,18 (12,16-61,23)	36,18 (12,16-61,23)	36,18 (12,16-61,23)	36,18 (12,16-61,23)	36,18 (12,16-61,23)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>									
Respuesta (RC+RP)	8,38 (3,67-15,58)	36,67 (26,28-47,08)	47,84 (36,56-58,26)	55,55 (43,91-65,70)	56,85 (45,18-66,94)	56,85 (45,18-66,94)	56,85 (45,18-66,94)	56,85 (45,18-66,94)	0,393
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	22,84 (9,04-40,36)	34,41 (16,96-52,66)	43,16 (23,28-61,60)	43,16 (23,28-61,60)	43,16 (23,28-61,60)	43,16 (23,28-61,60)	43,16 (23,28-61,60)	











## Análisis univariable EICR aguda grado II-IV

Variables	EICR aguda grado II-IV						p value
	20 días	40 días	60 días	80 días	100 días	120 días	
	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)
<b>Edad receptor, años</b>							
≤39años	9,52 (1,54-26,61)	24,60 (8,59-44,88)	24,60 (8,59-44,88)	34,66 (14,94-55,40)	34,66 (14,94-55,40)	34,66 (14,94-55,40)	34,66 (14,94-55,40)
40-59 años	2,70 (0,20-12,27)	16,22 (6,48-29,85)	16,22 (6,48-29,85)	24,32 (11,92-39,07)	24,32 (6,48-29,85)	24,32 (6,48-29,85)	24,32 (6,48-29,85)
>60 años	3,89 (0,70-11,90)	24,12 (13,26-36,76)	24,12 (13,26-36,76)	32,32 (23,32-50,15)	39,04 (25,23-52,61)	39,04 (13,26-36,76)	39,04 (13,26-36,76)
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>							
≤59 años	5,17 (1,34-13,07)	19,19 (10,18-30,35)	24,46 (14,20-36,22)	28,24 (17,15-40,39)	28,24 (17,15-40,39)	28,24 (17,15-40,39)	28,24 (17,15-40,39)
≥60 años	3,89 (0,70-11,90)	24,12 (13,26-36,76)	32,32 (19,74-45,56)	36,70 (23,32-50,15)	39,04 (25,23-52,61)	39,04 (25,23-52,61)	43,93 (29,28-57,64)
<b>Sexo receptor</b>							
Mujer	4,17 (0,75-12,69)	21,16 (10,83-33,80)	21,16 (10,83-33,80)	23,36 (12,42-36,27)	23,36 (12,42-36,27)	23,36 (12,42-36,27)	25,84 (14,19-39,13)
Varón	4,92 (1,28-12,47)	21,65 (12,22-32,84)	33,57 (21,87-45,68)	38,96 (26,46-51,26)	40,87 (28,09-53,23)	40,87 (28,09-53,23)	42,84 (29,78-55,25)
<b>Enfermedad de base</b>							
LA+Patología Mielóide	5,33 (1,71-12,09)	19,09 (11,01-28,86)	21,88 (13,19-31,99)	26,34 (16,73-36,95)	27,91 (17,99-38,69)	27,91 (17,99-38,69)	31,20 (20,66-42,31)
Patología linfóide+otros	2,94 (0,21-13,23)	26,47 (12,99-42,08)	41,18 (24,46-57,17)	44,27 (27,01-60,22)	44,27 (27,01-60,22)	44,27 (27,01-60,22)	44,27 (27,01-60,22)
<b>LMA vs. resto</b>							
LMA	0,00 (NaN-NaN)	12,81 (3,94-27,09)	16,04 (5,72-31,02)	19,40 (7,71-35,03)	22,76 (9,84-38,88)	22,76 (9,84-38,88)	26,12 (12,09-42,60)
Distinto de LMA	6,56 (2,41-13,65)	25,20 (16,01-35,45)	33,22 (22,82-43,96)	37,48 (26,52-48,40)	37,48 (26,52-48,40)	37,48 (26,52-48,40)	39,14 (27,92-50,17)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>							
Estadio precoz	4,88 (0,86-14,66)	19,51 (9,04-32,92)	26,83 (14,33-41,03)	29,44 (16,28-43,88)	32,16 (18,34-46,82)	32,16 (18,34-46,82)	34,87 (20,45-49,69)
Estadio intermedio	5,66 (1,46-14,21)	24,98 (14,14-37,39)	30,90 (18,84-43,77)	37,13 (23,96-50,32)	37,13 (23,96-50,32)	37,13 (23,96-50,32)	37,13 (23,96-50,32)
Estadio avanzado	0,00 (NaN-NaN)	13,85 (2,04-36,62)	21,03 (4,71-45,13)	21,03 (4,71-45,13)	21,03 (4,71-45,13)	21,03 (4,71-45,13)	30,24 (8,10-56,60)
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>							
Respuesta (RC+RP)	6,08 (2,24-12,71)	22,21 (13,85-31,81)	29,74 (20,13-39,95)	33,64 (23,49-44,08)	34,99 (24,66-45,50)	34,99 (24,66-45,50)	36,38 (25,87-46,95)
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	19,11 (6,77-36,17)	22,96 (9,10-40,54)	27,24 (11,73-45,42)	27,24 (11,73-45,42)	27,24 (11,73-45,42)	32,53 (14,77-51,73)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>							
Remisión completa	6,34 (1,62-15,78)	17,23 (7,98-29,43)	21,71 (11,10-34,59)	28,61 (16,24-42,25)	30,92 (18,05-44,72)	30,92 (18,05-44,72)	33,30 (19,93-47,25)
Remisión parcial	5,71 (0,99-16,93)	28,57 (14,71-44,10)	40,00 (23,72-55,79)	40,00 (23,72-55,79)	40,00 (23,72-55,79)	40,00 (23,72-55,79)	40,00 (23,72-55,79)
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	19,11 (6,77-36,17)	22,96 (9,10-40,54)	27,24 (11,73-45,42)	27,24 (11,73-45,42)	27,24 (11,73-45,42)	32,53 (14,77-51,73)

Variables	EICR aguda grado II-IV						p value
	20 días	40 días	60 días	80 días	100 días	120 días	
	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>							
Remisión completa	6,34 (1,62-15,78)	17,23 (7,98-29,43)	21,71 (11,10-34,59)	28,61 (16,24-42,25)	30,92 (18,05-44,72)	30,92 (18,05-44,72)	33,30 (19,93-47,25)
Distinto de remisión completa	3,23 (0,60-10,01)	24,48 (14,52-35,83)	32,69 (21,28-44,58)	34,46 (22,76-46,46)	34,46 (22,76-46,46)	34,46 (22,76-46,46)	36,52 (24,41-48,69)
<b>Trasplante previo</b>							
No TPH previo	2,63 (0,20-11,98)	24,08 (11,79-38,75)	29,51 (15,79-44,62)	35,40 (20,24-50,91)	35,40 (20,24-50,91)	35,40 (20,24-50,91)	35,40 (20,24-50,91)
SI TPH previo	7,14 (2,27-15,90)	23,80 (13,45-35,79)	33,09 (20,94-45,73)	35,06 (22,57-47,80)	37,03 (24,23-49,89)	37,03 (24,23-49,89)	38,99 (25,90-51,86)
<b>CMV estado serológico D/R</b>							
D-/R+	4,17 (0,28-17,99)	32,41 (13,91-52,54)	51,72 (28,26-70,89)	57,09 (32,40-75,66)	57,09 (32,40-75,66)	57,09 (32,40-75,66)	57,09 (32,40-75,66)
Resto (+ /+; + /-; - /-)	4,69 (1,51-10,72)	18,81 (11,31-27,79)	22,34 (14,15-31,71)	26,08 (17,21-35,83)	27,40 (18,29-37,28)	27,40 (18,29-37,28)	30,15 (20,57-40,29)
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>							
Isogrupo	6,76 (2,48-14,03)	21,90 (13,20-32,01)	27,48 (17,74-38,10)	31,98 (21,48-42,95)	33,56 (22,80-44,65)	33,56 (22,80-44,65)	36,81 (25,54-48,10)
Menor	0,00 (NaN-NaN)	2,22 (6,58-43,56)	27,78 (9,67-49,55)	33,33 (13,09-55,24)	33,33 (13,09-55,24)	33,33 (13,09-55,24)	33,33 (13,09-55,24)
Mayor+Bidireccional	0,00 (NaN-NaN)	18,75 (4,30-41,04)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>							
No	0,00 (NaN-NaN)	18,75 (4,30-41,04)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)	31,25 (10,79-54,46)
Sí	5,37 (1,98-11,28)	21,88 (14,02-30,87)	27,46 (18,70-36,93)	32,22 (22,77-42,03)	33,48 (23,85-43,37)	33,48 (23,85-43,37)	36,10 (26,10-46,16)
<b>Donante varón</b>							
No (Mujer)	3,23 (0,23-14,36)	19,35 (7,70-34,93)	25,81 (11,97-42,13)	29,34 (14,39-46,04)	29,34 (14,39-46,04)	29,34 (14,39-46,04)	33,52 (17,11-50,84)
Sí (Varón)	5,11 (1,64-11,62)	22,25 (13,66-32,17)	28,96 (19,18-39,45)	33,17 (22,75-43,92)	34,59 (23,97-45,42)	34,59 (23,97-45,42)	36,07 (25,25-46,98)
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>							
Receptor varón donante mujer	0,00 (NaN-NaN)	20,00 (2,64-40,04)	30,00 (6,23-59,33)	30,00 (6,23-59,33)	30,00 (6,23-59,33)	30,00 (6,23-59,33)	30,00 (6,23-59,33)
Otros	5,04 (1,86-10,63)	21,57 (13,99-30,24)	27,85 (19,29-37,04)	32,24 (23,09-41,72)	33,37 (24,08-42,92)	33,37 (24,08-42,92)	35,71 (26,13-45,39)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>							
No	2,44 (0,18-11,18)	29,27 (16,20-43,63)	36,59 (22,08-51,21)	44,51 (28,65-59,21)	44,51 (28,65-59,21)	44,51 (28,65-59,21)	47,29 (30,99-61,96)
Sí	5,86 (1,88-13,22)	16,53 (8,74-26,46)	22,71 (13,43-33,47)	24,32 (14,69-35,27)	26,04 (16,03-37,20)	26,04 (16,03-37,20)	27,85 (17,44-39,23)
<b>Global Criterios Ciurea en la selección del donante</b>							
0 o 1 criterio Ciurea	0,00	25,00 (9,89-43,57)	37,50 (18,55-56,50)	42,31 (21,94-61,40)	42,31 (21,94-61,40)	42,31 (21,94-61,40)	42,31 (21,94-61,40)
2 o 3 criterios Ciurea	5,87 (2,16-12,28)	20,34 (12,45-29,60)	25,24 (16,45-35,00)	29,07 (19,64-39,14)	30,38 (20,75-40,55)	30,38 (20,75-40,55)	33,12 (23,07-43,49)

Variables	EICR aguda grado II-IV								p value
	20 días	40 días	60 días	80 días	100 días	120 días	140 días		
	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	IA % (LC 95%)	
<b>Parentesco donante (díos grupos)</b>									
Hijo/a	4,39 (1,15-11,22)	19,22 (10,82-29,44)	26,70 (16,75-37,69)	29,89 (19,36-41,15)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	0,402
Hermano/a	4,88 (0,86-14,66)	25,44 (13,05-39,86)	30,59 (16,94-45,37)	36,14 (21,24-51,24)	36,14 (21,24-51,24)	36,14 (21,24-51,24)	36,14 (21,24-51,24)	41,97 (25,90-57,24)	
Progenitores+otros s-otros									
Hijo/a	4,39 (1,15-11,22)	19,22 (10,82-29,44)	26,70 (16,75-37,69)	29,89 (19,36-41,15)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	31,60 (20,75-43,01)	
Hermano/a	3,33 (0,24-14,79)	20,60 (8,18-36,89)	27,50 (12,76-44,51)	31,13 (15,30-48,40)	31,13 (15,30-48,40)	31,13 (15,30-48,40)	31,13 (15,30-48,40)	34,98 (18,02-52,52)	0,210
Progenitores+otros	9,09 (0,44-34,68)	39,39 (10,60-67,93)	39,39 (10,60-67,93)	51,52 (15,69-78,85)	51,52 (15,69-78,85)	51,52 (15,69-78,85)	51,52 (15,69-78,85)	63,64 (21,22-87,65)	
<b>Compatibilidad HLA HvG (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>									
5/10	4,89 (1,27-12,41)	19,65 (10,77-30,49)	27,85 (17,23-39,49)	33,05 (21,50-45,04)	34,91 (23,04-47,02)	34,91 (23,04-47,02)	34,91 (23,04-47,02)	38,74 (26,25-51,06)	0,642
≥6/10	4,17 (0,75-12,69)	24,01 (12,77-37,20)	28,48 (16,18-42,06)	30,86 (18,02-44,65)	30,86 (18,02-44,65)	30,86 (18,02-44,65)	30,86 (18,02-44,65)	30,86 (18,02-44,65)	
<b>Compatibilidad HLA GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>									
5/10	6,67 (2,12-14,91)	18,66 (9,89-29,59)	25,73 (15,27-37,52)	29,27 (18,11-41,33)	31,08 (19,60-43,27)	31,08 (19,60-43,27)	31,08 (19,60-43,27)	34,93 (22,74-47,37)	0,774
≥6/10	2,04 (0,16-9,52)	24,49 (13,48-37,24)	30,61 (18,31-43,80)	35,24 (21,97-48,77)	35,24 (21,97-48,77)	35,24 (21,97-48,77)	35,24 (21,97-48,77)	35,24 (21,97-48,77)	
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>									
No	2,78 (0,52-8,71)	17,16 (9,38-26,91)	24,42 (15,03-35,05)	27,61 (17,57-38,57)	27,61 (17,57-38,57)	27,61 (17,57-38,57)	27,61 (17,57-38,57)	31,15 (20,39-42,52)	0,094
Sí	8,04 (2,02-19,62)	29,68 (15,89-44,83)	35,09 (20,13-50,44)	40,50 (24,58-55,86)	43,33 (26,94-58,67)	43,33 (26,94-58,67)	43,33 (26,94-58,67)	43,33 (26,94-58,67)	
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>									
No	5,26 (0,33-22,02)	5,26 (0,33-22,02)	31,58 (12,43-52,88)	31,58 (12,43-52,88)	31,58 (12,43-52,88)	31,58 (12,43-52,88)	31,58 (12,43-52,88)	31,58 (12,43-52,88)	0,641
Sí	4,43 (1,43-10,15)	24,94 (16,43-34,38)	27,25 (18,38-36,87)	32,11 (22,53-42,06)	33,39 (23,63-43,43)	33,39 (23,63-43,43)	33,39 (23,63-43,43)	36,00 (25,89-46,20)	
<b>Ausencia de ligando KIR en receptor</b>									
No	7,90 (1,99-19,29)	21,05 (9,76-35,23)	36,84 (21,74-52,02)	36,84 (21,74-52,02)	36,84 (21,74-52,02)	36,84 (21,74-52,02)	36,84 (21,74-52,02)	39,86 (24,11-55,18)	0,578
Sí	2,82 (0,53-8,82)	21,64 (12,79-32,02)	23,12 (13,96-33,66)	29,53 (19,08-40,74)	31,26 (20,48-42,62)	31,26 (20,48-42,62)	31,26 (20,48-42,62)	32,98 (21,89-44,48)	
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>									
No	7,14 (1,81-17,61)	16,92 (7,34-29,86)	19,43 (9,00-32,82)	24,63 (12,61-38,76)	24,63 (12,61-38,76)	24,63 (12,61-38,76)	24,63 (12,61-38,76)	30,25 (16,66-45,04)	0,490
Sí	2,99 (0,55-9,31)	24,13 (14,59-34,99)	33,23 (22,17-44,69)	36,45 (24,92-48,05)	38,22 (26,41-49,91)	38,22 (26,41-49,91)	38,22 (26,41-49,91)	38,22 (26,41-49,91)	





## Análisis univariable EICR aguda grado III-IV

Variables	EICR aguda grado III-IV								p value
	20 días IA % (I.C. 95%)	40 días IA % (I.C. 95%)	60 días IA % (I.C. 95%)	80 días IA % (I.C. 95%)	100 días IA % (I.C. 95%)	120 días IA % (I.C. 95%)	140 días IA % (I.C. 95%)		
<b>Edad receptor, años</b>									
≤39 años	4,76 (0,30-20,20)	9,52 (1,53-26,64)	9,52 (1,53-26,64)	14,29 (3,40-32,65)	14,29 (3,40-32,65)	14,29 (3,40-32,65)	14,29 (3,40-32,65)	14,29 (3,40-32,65)	0,081
40-59 años	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	2,50 (0,19-11,44)	2,50 (0,19-11,44)	2,50 (0,19-11,44)	2,50 (0,19-11,44)	2,50 (0,19-11,44)	2,50 (0,19-11,44)	
>60 años	0,00 (NaN-NaN)	9,62 (3,49-19,50)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	17,45 (8,52-29,02)	17,45 (8,52-29,02)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>									
≤59 años	1,64 (0,13-7,80)	3,28 (0,60-10,17)	4,92 (1,28-12,47)	6,59 (2,10-14,75)	6,59 (2,10-14,75)	6,59 (2,10-14,75)	6,59 (2,10-14,75)	6,59 (2,10-14,75)	0,076
≥60 años	0,00 (NaN-NaN)	9,62 (3,49-19,50)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	15,43 (7,15-26,61)	17,45 (8,52-29,02)	17,45 (8,52-29,02)	
<b>Sexo receptor</b>									
Mujer	0,00 (NaN-NaN)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	6,12 (1,57-15,29)	0,337
Varón	1,56 (0,13-7,46)	6,25 (1,99-14,04)	12,53 (5,81-21,96)	14,12 (6,89-23,87)	14,12 (6,89-23,87)	14,12 (6,89-23,87)	14,12 (6,89-23,87)	14,12 (6,89-23,87)	
<b>Enfermedad de base categorizada</b>									
LA+Patología Mieloide	1,27 (0,11-6,14)	6,33 (2,33-13,20)	7,61 (3,08-14,86)	7,61 (3,08-14,86)	7,61 (3,08-14,86)	7,61 (3,08-14,86)	7,61 (3,08-14,86)	7,61 (3,08-14,86)	0,201
Patología linfocite+otros	0,00 (NaN-NaN)	5,88 (1,02-17,38)	14,71 (5,27-28,71)	17,65 (7,03-32,20)	17,65 (7,03-32,20)	17,65 (7,03-32,20)	17,65 (7,03-32,20)	17,65 (7,03-32,20)	
<b>LMA vs. resto</b>									
LMA	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	2,86 (0,21-12,91)	0,051
Distinto de LMA	1,28 (0,11-6,22)	8,97 (3,92-16,62)	12,82 (6,53-21,30)	14,14 (7,48-22,88)	14,14 (7,48-22,88)	14,14 (7,48-22,88)	15,49 (8,45-24,47)	15,49 (8,45-24,47)	
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>									
Estado precoz	0,00 (NaN-NaN)	4,55 (0,81-13,75)	6,82 (1,74-16,88)	6,82 (1,74-16,88)	6,82 (1,74-16,88)	6,82 (1,74-16,88)	6,82 (1,74-16,88)	6,82 (1,74-16,88)	0,127
Estado intermedio	1,85 (0,15-8,71)	5,56 (1,43-13,97)	9,26 (3,37-18,84)	11,11 (4,47-21,16)	11,11 (4,47-21,16)	11,11 (4,47-21,16)	11,11 (4,47-21,16)	11,11 (4,47-21,16)	
Estado avanzado	0,00 (NaN-NaN)	13,33 (1,99-35,47)	20,00 (4,52-43,32)	20,00 (4,52-43,32)	20,00 (4,52-43,32)	20,00 (4,52-43,32)	26,67 (7,53-50,89)	26,67 (7,53-50,89)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>									
Respuesta (RC+RP)	1,16 (0,10-5,68)	3,49 (0,92-9,03)	6,98 (2,83-13,68)	8,16 (3,57-15,19)	8,16 (3,57-15,19)	8,16 (3,57-15,19)	8,16 (3,57-15,19)	8,16 (3,57-15,19)	0,044
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	14,82 (4,52-30,81)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	22,42 (8,84-39,79)	22,42 (8,84-39,79)	

<b>Situación enfermedad</b>									
pretrasplante									
Remisión completa	1,96 (0,15-9,18)	1,96 (0,15-9,18)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)
Remisión parcial	0,00 (NaN-NaN)	5,71 (0,99-16,93)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)	14,29 (5,12-27,97)
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	14,82 (4,52-30,81)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	18,52 (6,57-35,19)	22,42 (8,84-39,79)
<b>Estado enfermedad</b>									
pretrasplante									
Remisión completa	1,96 (0,15-9,18)	1,96 (0,15-9,18)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)	3,92 (0,71-12,01)
Distinto de remisión completa	0,00 (NaN-NaN)	9,68 (3,90-18,61)	16,16 (8,25-26,42)	16,16 (8,25-26,42)	16,16 (8,25-26,42)	16,16 (8,25-26,42)	16,16 (8,25-26,42)	16,16 (8,25-26,42)	17,88 (9,47-28,44)
Trasplante previo									
No TPH previo	0,00 (NaN-NaN)	7,50 (1,90-18,42)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)	10,08 (3,14-21,83)
Sí TPH previo	1,72 (0,14-8,16)	6,90 (2,19-15,39)	12,07 (5,25-21,92)	13,79 (6,39-24,00)	13,79 (6,39-24,00)	13,79 (6,39-24,00)	13,79 (6,39-24,00)	13,79 (6,39-24,00)	13,79 (6,39-24,00)
<b>CMV estado serológico D/R</b>									
D-/R+	4,17 (0,28-17,99)	16,67 (5,04-34,15)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)	20,83 (7,34-38,98)
Resto (+ /+; +/-; -/-)	0,00 (NaN-NaN)	3,37 (0,90-8,74)	6,74 (2,74-13,25)	7,88 (3,45-14,70)	7,88 (3,45-14,70)	7,88 (3,45-14,70)	7,88 (3,45-14,70)	7,88 (3,45-14,70)	9,02 (4,19-16,13)
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>									
Isogrupo	1,33 (0,11-6,44)	5,33 (1,71-12,10)	8,00 (3,24-15,57)	9,36 (4,09-17,29)	9,36 (4,09-17,29)	9,36 (4,09-17,29)	9,36 (4,09-17,29)	9,36 (4,09-17,29)	10,71 (4,97-18,96)
Menor	0,00 (NaN-NaN)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)	14,29 (3,38-32,69)
Mayor+Bidireccional	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>									
No	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)	11,77 (1,81-31,95)
Sí	1,04 (0,90-5,13)	7,29 (3,20-13,66)	9,38 (4,58-16,24)	10,44 (5,32-17,55)	10,44 (5,32-17,55)	10,44 (5,32-17,55)	10,44 (5,32-17,55)	10,44 (5,32-17,55)	11,51 (6,08-18,84)
<b>Donante varón</b>									
No (Mujer)	3,03 (0,22-13,60)	3,03 (0,22-13,60)	6,06 (1,04-17,87)	6,06 (1,04-17,87)	6,06 (1,04-17,87)	6,06 (1,04-17,87)	6,06 (1,04-17,87)	6,06 (1,04-17,87)	9,21 (2,28-22,25)
Sí (Varón)	0,00 (NaN-NaN)	7,50 (3,04-14,65)	11,27 (5,50-19,33)	12,56 (6,40-20,89)	12,56 (6,40-20,89)	12,56 (6,40-20,89)	12,56 (6,40-20,89)	12,56 (6,40-20,89)	12,56 (6,40-20,89)
<b>Compatibilidad sexo D/R</b>									
Receptor varón donante mujer	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)
Otros	0,97 (0,08-4,80)	6,80 (2,98-12,77)	10,69 (5,65-17,57)	11,69 (6,37-18,76)	11,69 (6,37-18,76)	11,69 (6,37-18,76)	11,69 (6,37-18,76)	11,69 (6,37-18,76)	12,69 (7,11-19,96)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>									
No	0,00 (NaN-NaN)	9,30 (2,91-20,29)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)	13,95 (5,58-26,07)
Sí	1,43 (0,12-6,87)	4,29 (1,12-10,96)	7,14 (2,62-14,79)	8,62 (3,48-16,70)	8,62 (3,48-16,70)	8,62 (3,48-16,70)	8,62 (3,48-16,70)	8,62 (3,48-16,70)	10,12 (4,41-18,62)
<b>Global Criterios Ciurea en la selección del donante</b>									
0 o 1 criterio Ciurea en la selección donante	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)	7,69 (1,28-22,12)
la selección donante	1,15 (0,1-5,62)	8,05 (3,52-14,99)	10,35 (5,05-17,83)	11,53 (5,87-19,27)	11,53 (5,87-19,27)	11,53 (5,87-19,27)	11,53 (5,87-19,27)	11,53 (5,87-19,27)	12,71 (6,71-20,69)









## Análisis univariable EICR crónica

Variables	EICR crónica						p value
	5 meses IA % (I.C.95%)	10 meses IA % (I.C.95%)	15 meses IA % (I.C.95%)	20 meses IA % (I.C.95%)	25 meses IA % (I.C.95%)		
<b>Edad receptor, años</b>							
≤39 años	11,77 (1,82-31,91)	25,34 (7,26-48,74)	25,34 (7,26-48,74)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
40-59 años	13,33 (4,10-28,07)	20,44 (8,09-36,71)	24,27 (10,43-41,19)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,909
>60 años	2,44 (0,18-11,19)	20,72 (9,54-34,84)	26,66 (13,55-41,70)	35,92 (18,84-53,36)	35,92 (18,84-53,36)	35,92 (18,84-53,36)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>							
≤59 años	12,77 (5,12-24,04)	22,04 (11,24-35,11)	24,50 (12,99-37,93)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,678
≥60 años	2,44 (0,18-11,19)	20,72 (9,54-34,84)	26,66 (13,55-41,70)	35,92 (18,84-53,36)	35,92 (18,84-53,36)	35,92 (18,84-53,36)	
<b>Sexo receptor</b>							
Mujer	7,69 (1,94-18,84)	15,99 (6,35-29,53)	25,06 (12,17-40,28)	33,35 (17,23-50,37)	33,35 (17,23-50,37)	33,35 (17,23-50,37)	0,814
Varón	8,09 (2,55-17,83)	25,69 (14,09-38,97)	25,69 (14,09-38,97)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Enfermedad de base</b>							
LA+Patología Mieloide	8,17 (2,98-16,77)	23,48 (13,58-34,93)	29,24 (18,03-41,38)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,157
Patología linfóide+otros	7,41 (1,24-21,36)	16,32 (4,87-33,70)	16,32 (4,87-33,70)	16,32 (4,87-33,70)	16,32 (4,87-33,70)	16,32 (4,87-33,70)	
<b>LMA vs. resto</b>							
LMA	9,68 (2,40-23,18)	25,81 (11,96-42,14)	29,59 (14,46-46,46)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,651
Distinto de LMA	6,93 (2,20-15,46)	18,50 (9,58-30,52)	23,06 (12,59-35,39)	28,91 (16,44-42,60)	28,91 (16,44-42,60)	28,91 (16,44-42,60)	
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>							
Estadio precoz	10,81 (3,36-23,25)	29,84 (15,98-45,06)	29,84 (15,98-45,06)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,363
Estadio intermedio	7,14 (1,81-17,61)	17,94 (7,73-31,57)	23,71 (11,52-38,34)	28,03 (13,94-44,00)	28,03 (13,94-44,00)	28,03 (13,94-44,00)	
Estadio avanzado	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	12,50 (0,33-46,93)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>							
Respuesta (RC+RP)	9,88 (4,31-18,94)	26,56 (16,62-37,55)	29,30 (19,36-41,36)	32,12 (20,97-43,81)	32,12 (20,97-43,81)	32,12 (20,97-43,81)	0,097
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	6,88 (NaN-NaN)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>							
Remisión completa	9,30 (2,92-20,28)	26,19 (13,95-40,20)	26,19 (13,95-40,20)	26,19 (13,95-40,20)	26,19 (13,95-40,20)	26,19 (13,95-40,20)	0,163
Remisión parcial	10,71 (2,63-25,39)	27,40 (11,69-45,80)	37,09 (17,90-56,45)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
Enfermedad activa	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	6,88 (0,35-28,15)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	

Variables	EICR crónica					p value
	5 meses IA % (I.C.95%)	10 meses IA % (I.C.95%)	15 meses IA % (I.C.95%)	20 meses IA % (I.C.95%)	25 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Trasplante previo</b>						
No TPH previo	6,06 (1,05-17,85)	18,46 (7,32-33,56)	26,16 (11,91-42,95)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,964
Sí TPH previo	11,11 (4,02-22,27)	23,88 (12,15-37,80)	23,88 (12,15-37,80)	27,02 (14,23-41,55)	27,02 (14,23-41,55)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>						
D-/R+	11,77 (1,82-31,91)	18,63 (4,19-41,06)	18,63 (4,19-41,06)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,993
Resto (+/+; +/-; -/-)	7,03 (2,57-14,56)	21,96 (12,96-32,48)	26,78 (16,75-37,86)	29,20 (18,42-40,84)	29,20 (18,42-40,84)	
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>						
Isogrupo	10,32 (4,16-19,77)	25,25 (14,62-37,34)	27,40 (16,23-39,78)	27,40 (16,23-39,78)	27,40 (16,23-39,78)	
Menor	6,25 (0,36-25,48)	21,06 (4,57-45,53)	21,06 (4,57-45,53)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,967
Mayor+Bidireccional	0,00 (NaN-NaN)	7,14 (0,38-28,66)	21,43 (4,71-45,99)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>						
No	0,00 (NaN-NaN)	7,14 (0,38-28,66)	21,43 (4,71-45,99)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,826
Sí	9,43 (4,12-17,41)	24,25 (14,87-34,88)	25,95 (16,19-36,81)	28,79 (17,94-40,56)	28,79 (17,94-40,56)	
<b>Donante varón</b>						
No (Mujer)	4,76 (0,30-20,20)	14,57 (3,44-33,25)	14,57 (3,44-33,25)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,313
Sí (Varón)	8,92 (3,60-17,24)	23,62 (13,94-34,74)	29,11 (18,21-40,88)	31,29 (19,86-43,38)	31,29 (19,86-43,38)	
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>						
Receptor varón donante mujer	0,00 (NaN-NaN)	33,33 (3,20-70,43)	33,33 (3,20-70,43)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,804
Otros	8,51 (3,72-15,81)	20,37 (12,23-29,98)	24,82 (15,69-35,04)	28,88 (18,60-39,97)	28,88 (18,60-39,97)	
<b>Edad donante &lt;40 años</b>						
No	8,82 (2,20-21,33)	27,67 (13,50-43,85)	27,67 (13,50-43,85)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,607
Sí	7,38 (2,34-16,40)	17,39 (8,47-28,96)	24,03 (13,14-36,73)	26,72 (14,98-39,94)	26,72 (14,98-39,94)	
<b>Global Criterios Ciurea en la selección del donante</b>						
0 o 1 criterio Ciurea	0,00 (NaN-NaN)	11,51 (17,59-31,45)	11,51 (17,59-31,45)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,215
2 o 3 criterios Ciurea	9,97 (4,35-18,34)	23,98 (14,45-34,85)	29,17 (18,54-40,63)	31,22 (20,11-42,96)	31,22 (20,11-42,96)	
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>						
Hijo/a	5,42 (1,40-13,66)	20,87 (11,05-32,80)	27,08 (15,70-39,79)	33,13 (19,73-47,14)	33,13 (19,73-47,14)	0,6232
Hermano/a+Progenitores+otros	12,12 (3,75-25,78)	22,07 (9,51-37,89)	22,07 (9,51-37,89)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	

Variables	EICR crónica						p value
	5 meses IA % (I.C.95%)	10 meses IA % (I.C.95%)	15 meses IA % (I.C.95%)	20 meses IA % (I.C.95%)	25 meses IA % (I.C.95%)		
<b>Parentesco donante</b>							
Hijo/a	5,42 (1,40-13,66)	20,87 (11,05-32,80)	27,08 (15,70-39,79)	33,13 (19,73-47,14)	33,13 (19,73-47,14)		
Hermano/a	12,00 (2,91-28,05)	20,66 (7,24-38,79)	20,66 (7,24-38,79)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		0,853
Progenitores+otros	12,50 (0,48-44,48)	27,08 (2,94-61,63)	27,08 (2,94-61,63)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Compatibilidad HLA HvG (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>							
5/10	11,44 (4,60-21,73)	26,23 (14,80-39,16)	28,50 (16,53-41,68)	31,24 (18,49-44,86)	31,24 (18,49-44,86)		0,357
≥6/10	2,78 (0,20-12,58)	14,57 (5,19-28,52)	21,36 (9,15-36,93)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Compatibilidad HLA GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>							
5/10	7,59 (2,39-16,81)	20,06 (10,22-32,27)	26,89 (15,16-40,07)	29,89 (17,20-43,68)	29,89 (17,20-43,68)		0,847
≥6/10	8,42 (2,11-20,45)	23,50 (10,84-38,92)	23,50 (10,84-38,92)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>							
No	10,63 (4,28-20,30)	24,57 (13,83-36,94)	28,93 (17,13-41,82)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		0,438
Sí	3,13 (0,22-13,96)	16,06 (5,73-31,04)	19,74 (7,81-35,61)	25,95 (10,40-44,75)	25,95 (10,40-44,75)		
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>							
No	7,14 (0,39-28,49)	14,29 (2,05-37,77)	22,45 (4,76-48,05)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		0,884
Sí	8,08 (3,27-15,71)	22,77 (13,71-33,23)	25,97 (16,22-36,82)	28,43 (17,87-39,91)	28,43 (17,87-39,91)		
<b>Ausencia de ligando KIR en Recep</b>							
No	5,97 (1,03-17,63)	12,51 (3,83-26,60)	16,61 (5,77-32,31)	21,04 (8,03-38,16)	21,04 (8,03-38,16)		0,230
Sí	9,13 (3,32-18,59)	26,44 (15,35-38,89)	30,50 (18,55-43,30)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>							
No	8,82 (2,20-21,33)	18,42 (7,30-33,51)	25,34 (11,65-41,62)	29,54 (14,24-46,63)	29,54 (14,24-46,63)		0,977
Sí	7,38 (2,34-16,38)	23,21 (12,71-35,55)	25,32 (14,29-37,91)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>							
No (Neutral)	6,75 (2,15-15,09)	23,08 (13,01-34,86)	27,11 (16,06-39,40)	29,36 (17,74-41,95)	29,36 (17,74-41,95)		0,870
Sí (Better+ Best)	10,48 (2,57-24,91)	18,18 (6,39-34,74)	22,41 (8,75-39,91)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		

Variables	EICR crónica						p value
	5 meses IA % (I.C.95%)	10 meses IA % (I.C.95%)	15 meses IA % (I.C.95%)	20 meses IA % (I.C.95%)	25 meses IA % (I.C.95%)		
<b>Centrómero donante</b>							
AA	4,82 (0,85-14,51)	25,34 (12,96-39,75)	30,99 (17,08-46,00)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
AB	11,43 (3,54-24,46)	14,49 (5,17-28,37)	18,23 (7,14-33,36)	22,89 (9,48-39,73)	22,89 (9,48-39,73)	22,89 (9,48-39,73)	0,625
BB	8,33 (0,42-32,33)	26,67 (5,61-54,52)	26,67 (5,61-54,52)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Telómero donante</b>							
AA	7,08 (2,25-15,77)	20,76 (10,98-32,66)	25,00 (14,08-37,51)	27,68 (15,93-40,73)	27,68 (15,93-40,73)	27,68 (15,93-40,73)	0,779
AB	9,68 (2,40-23,18)	23,08 (9,95-39,39)	27,15 (12,43-44,25)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
BB	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Gen 2DS2 en donante</b>							
No	4,40 (0,79-13,34)	22,99 (11,75-36,45)	28,04 (15,42-42,10)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,760
Sí	11,69 (4,22-23,34)	19,48 (8,97-32,96)	22,48 (10,88-36,62)	27,51 (13,26-43,86)	27,51 (13,26-43,86)	27,51 (13,26-43,86)	
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>							
Donante AA/ Receptor AA	8,33 (0,42-32,33)	16,67 (2,35-42,50)	25,93 (5,52-53,31)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
Donante AB/ Receptor AA	9,09 (0,44-34,68)	39,39 (10,44-68,11)	39,39 (10,44-68,11)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
Donante AB/ Receptor AB	10,47 (3,79-21,10)	19,42 (9,46-32,02)	21,94 (11,16-35,02)	26,40 (13,34-41,46)	26,40 (13,34-41,46)	26,40 (13,34-41,46)	0,755
Donante AA/ Receptor AB	0,00 (NaN-NaN)	20,19 (4,54-43,72)	26,92 (7,75-51,01)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Genotipo KIR Donante</b>							
AA	3,45 (0,24-15,24)	18,70 (6,59-35,57)	27,03 (11,56-45,24)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,935
Bx(AB+BB)	10,03 (4,04-19,24)	22,54 (12,70-34,10)	24,58 (14,20-36,47)	28,16 (16,19-41,40)	28,16 (16,19-41,40)	28,16 (16,19-41,40)	
<b>B-content score Donante</b>							
0	3,45 (0,24-15,24)	18,70 (6,59-35,57)	27,03 (11,56-45,24)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,987
1	9,68 (2,40-23,18)	26,58 (12,28-43,29)	26,58 (12,28-43,29)	26,58 (12,28-43,29)	26,58 (12,28-43,29)	26,58 (12,28-43,29)	
2+3+4	10,48 (2,57-24,91)	18,18 (6,39-34,74)	22,41 (8,75-39,91)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>							
Neutral	6,75 (2,15-15,09)	23,08 (13,01-34,86)	27,11 (16,06-39,40)	29,36 (17,74-41,95)	29,36 (17,74-41,95)	29,36 (17,74-41,95)	0,961
Better	11,77 (1,81-31,93)	11,77 (1,81-31,93)	19,68 (4,21-43,43)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
Best	8,33 (0,42-32,33)	26,67 (5,61-54,52)	26,67 (5,61-54,52)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	
<b>Genotipo KIR receptor</b>							
AA	8,70 (1,42-24,60)	26,96 (10,61-46,49)	32,22 (13,77-52,37)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)	0,586
Bx(AB+BB)	7,67 (2,80-15,82)	19,37 (10,57-30,15)	22,97 (13,24-34,28)	29,03 (16,90-42,30)	29,03 (16,90-42,30)	29,03 (16,90-42,30)	

Variables	EiCR crónica						p value
	5 meses IA % (I.C.95%)	10 meses IA % (I.C.95%)	15 meses IA % (I.C.95%)	20 meses IA % (I.C.95%)	25 meses IA % (I.C.95%)		
<b>Profilaxis EiCR</b>							
ICN + MMF	3,54 (0,65-10,92)	20,31 (10,77-31,98)	24,47 (13,80-36,75)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		0,915
Otros (ICN aislada o ICN+Sitrolimus + MMF)	16,63 (5,58-30,30)	23,49 (9,99-40,21)	27,54 (12,53-44,91)	27,54 (12,53-44,91)	27,54 (12,53-44,91)		
<b>Régimen de acondicionamiento</b>							
Intensidad reducida	4,82 (1,25-12,23)	19,23 (10,15-30,48)	23,19 (13,03-35,06)	28,87 (16,75-42,16)	28,87 (16,75-42,16)		0,553
Mieloablativo	15,39 (4,68-31,84)	26,92 (11,63-44,92)	31,03 (14,36-49,37)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		
<b>Fuente de progenitores</b>							
Sangre periférica	7,99 (3,23-15,55)	20,73 (12,22-30,78)	25,34 (15,82-35,99)	29,61 (18,88-41,13)	29,61 (18,88-41,13)		0,963
Medula ósea	7,69 (0,41-30,28)	26,31 (5,10-54,92)	26,31 (5,10-54,92)	NA (NA-NA)	NA (NA-NA)		

**Análisis univariable: RECAÍDA**

Variables	RECAÍDA				p value
	3 meses IA % (I.C.95%)	6 meses IA % (I.C.95%)	12 meses IA % (I.C.95%)	29 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>					
≤59 años	4,92 (1,28-12,48)	10,03 (4,03-19,26)	13,60 (6,28-23,73)	25,24 (14,01-38,13)	0,176
≥60 años	1,97 (0,15-9,22)	3,93 (0,71-12,06)	10,24 (3,68-20,75)	15,41 (5,26-30,50)	
<b>Sexo receptor</b>					
Varón	6,27 (1,60-15,62)	12,65 (5,06-23,85)	17,08 (7,89-29,24)	24,49 (11,78-39,64)	0,409
Mujer	1,56 (0,13-7,48)	3,16 (0,58-9,84)	8,15 (2,96-16,78)	17,92 (8,46-30,22)	
<b>Enfermedad de base (dos grupos)</b>					
LA+Patología mielóide	5,14 (1,65-11,69)	7,75 (3,14-15,13)	14,63 (7,72-23,66)	27,26 (16,07-39,70)	0,045
Patología linfóide+otros	0,00 (NaN-NaN)	6,01 (1,02-17,81)	6,01 (1,02-17,81)	6,01 (1,02-17,81)	
<b>LMA vs. resto</b>					
LMA	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	9,01 (2,23-21,81)	28,66 (12,92-46,62)	0,388
Distinto de LMA	5,21 (1,67-11,83)	10,54 (4,89-18,70)	13,38 (6,80-22,20)	16,39 (8,22-27,01)	
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>					
Estado precoz	0,00 (NaN-NaN)	2,27 (0,17-10,52)	7,13 (1,79-17,66)	21,70 (9,03-37,89)	0,039
Estado intermedio	1,89 (0,15-8,90)	5,73 (1,47-14,39)	9,85 (3,55-20,00)	12,05 (4,80-22,88)	
Estado avanzado	20,00 (4,45-43,51)	27,62 (7,52-52,75)	35,24 (10,88-61,23)	42,86 (14,56-68,89)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>					
Respuesta (RC+RP)	1,18 (0,10-5,75)	4,73 (1,52-10,81)	9,77 (4,53-17,42)	18,58 (10,21-28,91)	0,456
Enfermedad activa	11,11 (2,68-26,34)	15,06 (4,51-31,45)	19,45 (6,68-37,15)	25,60 (9,34-45,70)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>					
Remisión completa	1,96 (0,15-9,20)	3,92 (0,71-12,02)	12,27 (4,90-23,23)	25,97 (13,50-40,34)	0,173
Remisión parcial	0,00 (NaN-NaN)	6,01 (1,03-17,78)	6,01 (1,03-17,78)	6,01 (1,03-17,78)	
Enfermedad activa	11,11 (2,68-26,34)	15,06 (4,51-31,45)	19,45 (6,68-37,15)	25,60 (9,34-45,70)	
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>					
Remisión completa	1,96 (0,15-9,20)	3,92 (0,71-12,02)	12,27 (4,90-23,23)	25,97 (13,50-40,34)	0,316
Distinto de remisión completa	6,58 (2,09-14,74)	10,03 (4,03-19,27)	11,92 (5,16-21,74)	16,35 (6,72-29,69)	
<b>Trasplante previo</b>					
No TPH previo	2,58 (0,19-11,78)	2,58 (0,19-11,78)	8,12 (2,02-19,88)	11,31 (3,46-24,38)	0,280
Sí TPH previo	1,72 (0,14-8,18)	7,02 (2,22-15,68)	12,72 (5,51-23,07)	22,29 (11,66-35,04)	



Variables	RECAÍDA				p value
	3 meses	6 meses	12 meses	29 meses	
	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>					
D-/R+	0,00 (NaN-NaN)	4,41 (0,28-19,09)	13,87 (3,23-32,08)	21,74 (5,71-44,35)	0,749
Resto (+/+; +/-; -/-)	4,49 (1,45-10,29)	7,92 (3,46-14,77)	11,56 (5,88-19,35)	20,25 (11,54-30,69)	
<b>R/D incompatibilidad mayor en grupo ABO + incompatibilidad bidireccional</b>					
No	4,17 (1,35-9,58)	7,34 (3,21-13,75)	11,89 (6,26-19,46)	21,12 (12,18-31,71)	0,995
Sí	0,00 (NaN-NaN)	6,28 (0,35-25,75)	12,55 (1,87-33,87)	18,82 (4,25-41,36)	
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>					
Isogrupo	2,67 (0,50-8,39)	6,74 (2,47-14,02)	12,48 (6,07-21,30)	21,39 (10,62-34,62)	
Menor	9,52 (1,51-26,75)	9,52 (1,51-26,75)	9,52 (1,51-26,75)	23,28 (6,44-46,09)	0,965
Mayor+Bidireccional	0,00 (NaN-NaN)	6,28 (0,35-25,75)	12,55 (1,87-33,87)	18,82 (4,25-41,36)	
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>					
No	0,00 (NaN-NaN)	6,28 (0,35-25,75)	12,55 (1,87-33,87)	18,82 (4,25-41,36)	0,995
Sí	4,17 (1,35-9,58)	7,34 (3,21-13,75)	11,89 (6,26-19,46)	21,12 (12,18-31,71)	
<b>Donante varón</b>					
No (Mujer)	12,59 (3,87-26,71)	15,73 (5,60-30,53)	22,60 (9,71-38,74)	34,05 (14,69-54,59)	0,041
Sí (Varón)	0,00 (NaN-NaN)	3,83 (1,01-9,88)	7,89 (3,18-15,41)	15,56 (7,75-25,84)	
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>					
Receptor varón donante mujer	10,00 (0,41-38,17)	10,00 (0,41-38,17)	10,00 (0,1-38,17)	NA (NA-NA)	0,732
Otros	2,95 (0,79-7,70)	6,94 (3,04-13,03)	12,28 (6,68-19,70)	20,49 (12,14-30,38)	
<b>Edad donante &lt;40 años</b>					
No	2,33 (0,18-10,74)	4,72 (0,83-14,27)	10,08 (3,11-21,94)	13,77 (4,76-27,49)	0,253
Sí	4,36 (1,14-11,15)	8,75 (3,53-16,94)	13,27 (6,46-22,55)	25,11 (13,75-38,20)	
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>					
0 o 1	4,05 (0,27-17,66)	8,10 (1,32-23,23)	12,42 (2,95-29,08)	17,09 (5,06-35,15)	0,880
2 o 3	3,45 (0,91-8,94)	6,95 (2,82-13,65)	11,98 (6,08-20,01)	21,73 (12,30-32,91)	

Variables	RECAÍDA						p value	
	3 meses		6 meses		12 meses			29 meses
	IA %	IA %	IA %	IA %	IA %	IA %	IA %	
	(I.C.95%)	(I.C.95%)	(I.C.95%)	(I.C.95%)	(I.C.95%)	(I.C.95%)	(I.C.95%)	
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>								
Hijo/a	2,95 (0,55-9,21)	7,40 (2,70-15,29)	12,13 (5,61-21,34)	16,67 (8,31-27,51)	0,384			
Hermano/a+Progenitores+otros	4,55 (0,81-13,78)	6,89 (1,74-17,09)	11,86 (4,24-23,72)	26,86 (12,33-43,79)				
<b>Parentesco donante</b>								
Hijo/a	2,95 (0,55-9,21)	7,40 (2,70-15,29)	12,13 (5,61-21,34)	16,67 (8,31-27,51)				
Hermano/a	6,25 (1,07-18,40)	9,38 (2,31-22,59)	16,10 (5,69-31,25)	30,22 (13,43-49,00)	0,258			
Progenitores+otros	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	16,67 (0,41-55,70)				
<b>Compatibilidad HLA Hvg</b>								
(A, B, C, DRB1, DQB1)								
5/10	3,13 (0,58-9,75)	7,93 (2,89-16,32)	14,85 (7,22-25,05)	26,93 (15,06-40,28)	0,112			
≥6/10	4,17 (7,46-12,72)	6,25 (1,59-15,61)	8,57 (2,67-18,89)	12,19 (4,15-24,86)				
<b>Compatibilidad HLA GvH</b>								
(A, B, C, DRB1, DQB1)								
5/10	3,28 (0,60-10,18)	8,30 (3,02-17,03)	17,42 (8,85-28,37)	24,56 (12,28-39,07)	0,297			
≥6/10	3,94 (0,71-12,09)	5,91 (1,51-14,83)	5,91 (1,51-14,83)	16,54 (7,03-29,54)				
<b>Incompatibilidad ligando-ligando</b>								
(Perugia)								
No	4,11 (1,08-10,55)	6,96 (2,54-14,44)	11,51 (5,32-20,34)	22,40 (12,14-34,61)	0,718			
Sí	2,57 (0,19-11,76)	7,71 (1,94-18,92)	13,17 (4,70-26,07)	17,23 (6,62-32,01)				
<b>Incompatibilidad receptor-ligando</b>								
(Memphis)								
No	5,26 (0,32-22,18)	10,53 (1,62-29,26)	10,53 (1,62-29,26)	19,30 (3,80-43,71)	0,919			
Sí	3,23 (0,86-8,40)	6,51 (2,64-12,82)	12,39 (6,53-20,23)	21,00 (12,20-31,42)				
<b>Ausencia de ligando KIR en Recep</b>								
No	2,56 (0,19-11,73)	7,87 (1,97-19,28)	13,83 (4,90-27,33)	21,34 (8,96-37,21)	0,797			
Sí	4,12 (1,08-10,57)	6,89 (2,52-14,31)	11,28 (5,22-19,93)	20,46 (10,62-32,54)				
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>								
No	7,14 (1,81-17,62)	9,60 (3,00-20,90)	14,90 (5,92-27,75)	26,13 (12,28-42,36)	0,395			
Sí	1,43 (0,12-6,90)	5,79 (1,85-13,08)	10,36 (4,50-19,06)	16,33 (8,18-26,94)				

Variables	RECAÍDA				p value
	3 meses IA % (I.C.95%)	6 meses IA % (I.C.95%)	12 meses IA % (I.C.95%)	29 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>					
No (Neutral)	2,86 (0,53-8,95)	7,17 (2,62-14,85)	11,86 (5,48-20,90)	24,40 (13,72-36,73)	0,450
Sí (Better+ Best)	4,80 (0,84-14,49)	7,29 (1,83-18,01)	12,67 (4,50-25,25)	12,67 (4,50-25,25)	
<b>Centrómero donante</b>					
AA	1,92 (0,15-9,4)	3,85 (0,69-11,81)	9,97 (3,59-20,22)	21,56 (9,87-36,20)	0,967
AB	7,14 (1,81-17,62)	12,14 (4,36-24,17)	12,14 (4,36-24,17)	19,93 (8,11-35,50)	
BB	0,00 (NaN-NaN)	5,67 (0,32-23,86)	17,00 (3,82-38,23)	17,00 (3,82-38,23)	
<b>Telómero donante</b>					
AA	2,99 (0,55-9,32)	9,01 (3,64-17,43)	13,69 (6,67-23,21)	24,95 (13,95-37,59)	0,400
AB	2,52 (0,19-11,56)	2,52 (0,19-11,56)	8,50 (2,08-20,80)	12,53 (3,70-27,03)	
BB	20,00 (0,24-65,03)	20,00 (0,24-65,03)	20,00 (0,24-65,03)	NA	
<b>Gen 2DS2 en donante</b>					
No	1,79 (0,14-8,44)	3,57 (0,65-11,02)	9,22 (3,34-18,80)	22,28 (10,86-36,21)	0,855
Sí	5,37 (1,39-13,56)	10,98 (4,40-20,96)	15,02 (6,92-26,03)	17,29 (8,38-28,88)	
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>					
Donante AA/ Receptor AA	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	7,69 (0,40-30,38)	19,78 (2,27-49,96)	0,955
Donante AB/ Receptor AA	7,14 (0,38-28,66)	15,00 (2,12-39,31)	15,00 (2,12-39,31)	15,00 (2,12-39,31)	
Donante AB/ Receptor AB	4,63 (1,21-11,80)	7,79 (2,84-16,06)	12,89 (5,95-22,61)	20,46 (10,43-32,83)	
Donante AA/ Receptor AB	0,00 (NaN-NaN)	5,26 (0,32-22,14)	10,53 (1,63-29,20)	23,95 (6,68-47,00)	
<b>Genotipo KIR Donante</b>					
AA	0,00 (NaN-NaN)	3,13 (0,22-14,00)	9,51 (2,34-22,89)	23,32 (8,42-42,47)	0,995
Bx(AB+BB)	5,01 (1,61-11,42)	8,89 (3,88-16,48)	13,10 (6,65-21,77)	19,24 (10,50-29,97)	
<b>B-content score Donante</b>					
0	0,00 (NaN-NaN)	3,13 (0,22-14,00)	9,51 (2,34-22,89)	23,32 (8,42-42,47)	0,677
1	5,26 (0,92-15,74)	10,62 (3,29-22,92)	13,83 (4,90-27,32)	25,38 (11,34-42,16)	
2+3+4	4,80 (0,84-14,49)	7,29 (1,83-18,01)	12,67 (4,50-25,25)	12,67 (4,50-25,25)	
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>					
Neutral	2,86 (0,53-8,95)	7,17 (2,62-14,85)	11,86 (5,48-20,90)	24,40 (13,72-36,73)	0,608
Better	8,33 (1,35-23,81)	8,33 (1,35-23,81)	8,33 (1,35-23,81)	8,33 (1,35-23,81)	
Best	0,00 (NaN-NaN)	5,67 (0,32-23,86)	17,00 (3,82-38,23)	17,00 (3,82-38,23)	

Variables	RECAÍDA						p value	
	3 meses		6 meses		12 meses			29 meses
	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	IA % (I.C.95%)	
<b>Genotipo KIR receptor</b>								
AA	3,70 (0,25-16,27)	7,58 (1,26-21,85)	11,45 (2,78-26,97)	17,58 (4,94-36,61)	0,631			
Bx(AB+BB)	3,54 (0,94-9,16)	7,12 (2,88-13,95)	12,21 (6,21-20,38)	21,47 (12,33-32,27)				
<b>Profilaxis EICR</b>								
ICN + MMF	5,48 (1,76-12,42)	6,85 (2,51-14,22)	13,92 (7,08-23,02)	21,63 (12,25-32,74)	0,486			
Otros (ICN aislada o ICN+Sirolimus + MMF)	0,00 (NaN-NaN)	8,02 (2,00-19,62)	8,02 (2,00-19,62)	19,16 (5,62-38,75)				
<b>Fuente de progenitores</b>								
Sangre periférica	4,04 (1,31-9,31)	8,11 (3,77-14,59)	13,41 (7,50-21,05)	22,48 (13,87-32,37)	0,138			
Medula ósea	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	0,00 (NaN-NaN)	NA				

## Análisis univariable: MNRR

VARIABLES	MNRR				p value
	3 meses IA % (I.C.95%)	6 meses IA % (I.C.95%)	12 meses IA % (I.C.95%)	29 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Edad receptor, años</b>					
≤39 años	9,52 (1,53-26,63)	14,29 (3,39-32,65)	14,29 (3,39-32,65)	14,29 (3,39-32,65)	0,218
40-59 años	22,50 (11,02-36,47)	25,00 (12,83-39,22)	27,70 (14,78-42,22)	27,70 (14,78-42,22)	
>60 años	15,43 (0,07-0,27)	23,30 (0,13-0,36)	33,33 (0,21-0,46)	33,33 (0,21-0,46)	
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>					
≤59 años	18,03 (9,56-28,65)	21,31 (12,03-32,36)	23,07 (13,36-34,35)	23,07 (13,36-34,35)	0,178
≥60 años	15,43 (7,15-26,60)	23,30 (12,80-35,61)	33,33 (20,74-46,43)	43,85 (25,77-60,58)	
<b>Sexo receptor</b>					
Varón	21,88 (12,66-32,70)	28,19 (17,73-39,59)	33,29 (21,92-45,07)	39,39 (23,57-54,85)	0,152
Mujer	10,20 (3,70-20,60)	14,38 (6,25-25,77)	20,82 (10,63-33,33)	25,05 (12,72-39,49)	
<b>Enfermedad de base (dos grupos)</b>					
LA+Patología mielóide	13,92 (7,36-22,54)	20,39 (12,27-29,97)	25,73 (16,56-35,89)	25,73 (16,56-35,89)	0,229
Patología linfóide+otros	23,53 (10,91-38,87)	26,47 (12,99-42,08)	32,76 (17,56-48,88)	46,28 (23,60-66,29)	
<b>LMA vs. resto</b>					
LMA	11,43 (3,54-24,45)	14,29 (5,12-27,97)	17,14 (6,84-31,37)	17,14 (6,84-31,37)	0,072
Distinto de LMA	19,29 (11,38-28,77)	25,85 (16,65-36,02)	32,82 (22,48-43,53)	39,52 (26,27-52,48)	
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>					
Estadio precoz	15,91 (6,91-28,24)	15,91 (6,91-28,24)	20,46 (10,01-33,49)	20,45 (10,01-33,49)	0,186
Estadio intermedio	16,75 (8,18-27,93)	22,42 (12,31-34,40)	28,49 (16,94-41,14)	38,40 (21,44-55,16)	
Estadio avanzado	20,00 (4,54-43,27)	41,91 (15,76-66,40)	49,52 (20,31-73,36)	49,52 (20,31-73,36)	
<b>Respuesta enfermedad pretrasplante</b>					
Respuesta (RC+RP)	13,98 (7,63-22,22)	17,52 (10,31-26,30)	21,13 (13,16-30,37)	28,29 (16,41-41,40)	0,022
Enfermedad activa	25,93 (11,22-43,47)	37,53 (19,39-55,68)	49,82 (28,86-67,66)	49,82 (28,86-67,66)	
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>					
Remisión completa	13,73 (5,97-24,68)	17,65 (8,62-29,29)	19,66 (10,05-31,62)	23,54 (12,01-37,27)	0,065
Remisión parcial	14,47 (5,18-28,31)	17,42 (6,94-31,84)	23,55 (10,89-38,94)	41,16 (9,07-72,01)	
Enfermedad activa	25,93 (11,22-43,47)	37,53 (19,39-55,68)	49,82 (28,86-67,66)	49,82 (28,86-67,66)	

VARIABLES	MNRR				p value
	3 meses IA % (I.C. 95%)	6 meses IA % (I.C. 95%)	12 meses IA % (I.C. 95%)	29 meses IA % (I.C. 95%)	
<b>Estado enfermedad pretrasplante</b>					
Remisión completa	17,65 (8,62-29,29)	17,65 (8,62-29,29)	19,66 (10,05-31,62)	23,54 (12,01-37,27)	0,124
Distinto de remisión completa	22,74 (13,16-33,89)	31,32 (20,04-43,24)	34,94 (23,04-47,09)	41,03 (24,81-56,59)	
<b>Trasplante previo</b>					
No TPH previo	15,00 (6-27,83)	17,58 (7,62-30,90)	28,08 (14,98-42,75)	28,08 (14,98-42,75)	0,951
Sí TPH previo	18,97 (10,06-30,01)	24,22 (14,05-35,90)	26,03 (15,46-37,90)	31,77 (17,30-47,27)	
<b>CMV estado serológico D/R</b>					
D-/R+	25,00 (9,89-43,58)	29,41 (1,27-48,40)	38,87 (19,05-58,36)	58,56 (12,78-87,01)	0,079
Resto (+/+, +/-, -/-)	14,61 (8,20-22,78)	20,26 (12,61-29,20)	24,94 (16,43-34,38)	27,15 (17,87-37,26)	
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>					
Isogrupo	17,33 (9,75-26,74)	22,72 (13,95-32,78)	29,73 (19,71-40,42)	33,27 (21,54-45,42)	
Menor	19,05 (5,71-38,27)	23,81 (8,34-43,64)	28,57 (11,24-48,77)	28,57 (11,24-48,77)	0,827
Mayor+Bidireccional	12,16 (1,85-32,84)	18,43 (4,22-10,51)	18,43 (4,22-10,51)	34,12 (6,18-66,01)	
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>					
No	12,16 (1,85-32,84)	18,43 (4,22-40,51)	18,43 (4,22-40,51)	34,12 (6,18-66,01)	0,556
Sí	17,71 (10,82-25,99)	22,95 (15,08-31,81)	29,54 (20,65-38,96)	31,90 (22,16-42,06)	
<b>Donante varón</b>					
No (Mujer)	21,33 (9,23-36,71)	24,48 (11,33-40,26)	27,80 (13,60-43,98)	35,43 (16,15-55,40)	0,759
Sí (Varón)	15,00 (8,19-23,73)	21,27 (13,05-30,84)	27,78 (18,37-37,97)	31,55 (20,10-43,63)	
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>					
Receptor varón donante mujer	30,00 (6,23-59,33)	30,00 (6,23-59,33)	40,00 (10,74-68,64)	NA	0,403
Otros	15,56 (9,32-23,25)	21,49 (14,09-29,91)	26,56 (18,36-35,45)	31,60 (21,32-42,36)	
<b>Edad donante &lt;40 años</b>					
No	16,28 (7,07-28,83)	21,00 (10,27-34,29)	30,95 (17,60-45,31)	35,21 (20,10-50,70)	0,586
Sí	17,21 (9,41-26,98)	23,05 (13,92-33,56)	26,02 (16,30-36,82)	30,91 (18,02-44,73)	
<b>Criterios Citeura cumplidos en la selección del donante</b>					
0 o 1	23,08 (9,15-40,70)	27,13 (11,71-45,21)	31,44 (14,53-49,96)	38,80 (17,77-59,51)	0,418
2 o 3	14,94 (8,39-23,27)	20,73 (12,90-29,83)	26,70 (17,81-36,39)	30,38 (19,44-42,04)	

VARIABLES	MNRR				p value
	3 meses IA % (I.C.95%)	6 meses IA % (I.C.95%)	12 meses IA % (I.C.95%)	29 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>					
Hijo/a	14,56 (7,43-23,99)	20,49 (11,83-30,80)	28,07 (17,89-39,15)	36,05 (21,90-50,38)	0,920
Hermano/a+Progenitores+otros	20,46 (10,01-33,48)	25,00 (13,33-38,54)	27,43 (15,13-41,23)	27,43 (15,13-41,23)	
<b>Parentesco donante</b>					
Hijo/a	14,56 (7,43-23,99)	20,49 (11,83-30,80)	28,07 (17,89-39,15)	36,05 (21,90-50,38)	
Hermano/a	15,63 (5,58-30,30)	21,88 (9,47-37,53)	25,15 (11,64-41,23)	25,15 (11,64-41,23)	0,760
Progenitores+otros	33,33 (9,38-60,04)	33,33 (9,38-60,04)	33,33 (9,38-60,04)	33,33 (9,38-60,04)	
<b>Compatibilidad HLA HvG (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>					
5/10	13,90 (6,79-23,52)	20,26 (11,41-30,91)	23,53 (13,92-34,57)	27,65 (15,78-40,87)	0,219
≥6/10	20,83 (10,66-33,32)	25,00 (13,77-37,94)	33,48 (20,49-46,99)	38,91 (22,85-54,70)	
<b>Compatibilidad HLA GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>					
5/10	9,83 (3,97-18,89)	14,82 (7,24-24,97)	18,28 (9,68-29,04)	22,16 (11,47-35,04)	0,017
≥6/10	25,10 (14,22-37,54)	31,01 (18,92-43,90)	39,04 (25,63-52,21)	44,59 (27,88-60,01)	
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>					
No	17,81 (10,02-27,42)	24,74 (15,48-35,14)	33,49 (22,76-44,55)	38,39(24,53-52,08)	0,142
Sí	15,14 (6,05-28,08)	17,71 (7,68-31,13)	17,71 (7,68-31,13)	23,14 (9,87-39,65)	
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>					
No	21,05 (6,26-41,64)	31,58 (12,40-52,91)	36,84 (15,87-58,17)	36,84 (15,87-58,17)	0,435
Sí	16,00 (9,40-24,15)	20,34 (12,84-29,06)	26,00 (17,49-35,31)	31,60 (20,65-43,13)	
<b>Ausencia de ligando KIR en Recep</b>					
No	12,82 (4,61-25,37)	23,17 (11,34-37,44)	34,18 (19,49-49,43)	43,08 (21,22-63,28)	0,378
Sí	18,98(10,95-28,70)	21,73 (13,10-31,78)	25,53(15,34-34,87)	27,30 (17,01-38,62)	
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>					
No	11,91 (4,29-23,72)	16,67 (7,23-29,46)	21,67 (10,59-35,29)	27,47 (12,82-44,37)	0,264
Sí	19,77 (11,41-29,79)	25,55 (16,00-36,21)	31,51 (20,49-42,62)	35,23 (22,86-47,83)	

VARIABLES	MNRR				p value
	3 meses IA % (I.C.95%)	6 meses IA % (I.C.95%)	12 meses IA % (I.C.95%)	29 meses IA % (I.C.95%)	
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>					
No (Neutral)	11,43 (5,31-20,15)	14,29 (7,29-23,56)	18,65 (10,49-28,62)	23,03 (12,11-36,01)	0,004
Sí (Better+ Best)	25,65 (13,68-39,44)	35,34 (21,24-49,75)	43,10 (27,59-57,68)	50,47 (29,72-68,02)	
<b>Centrómero donante</b>					
AA	15,39 (7,13-26,53)	21,15 (11,24-33,16)	25,00 (14,16-37,41)	32,63 (15,61-50,90)	0,292
AB	11,91 (4,29-23,72)	16,82 (7,29-29,72)	24,54 (12,54-38,64)	29,16 (14,93-45,00)	
BB	31,98 (12,52-53,50)	37,65 (16,17-59,24)	43,32 (19,99-64,74)	43,32 (19,99-64,74)	
<b>Telómero donante</b>					
AA	11,94 (5,54-20,99)	16,42 (8,69-26,28)	21,09 (12,18-31,65)	21,09 (12,18-31,65)	0,021
AB	21,95 (10,75-35,67)	27,08 (14,44-41,39)	35,01 (20,53-49,86)	50,16 (25,42-70,64)	
BB	40,00 (3,06-78,61)	60,00 (4,79-91,77)	60,00 (4,79-91,77)	NA	
<b>Gen 2DS2 en donante</b>					
No	14,29 (6,62-24,79)	19,64 (10,42-30,99)	23,21 (13,13-34,98)	30,03 (14,68-47,04)	0,342
Sí	19,41 (10,29-30,66)	24,88 (14,43-36,79)	32,77 (20,65-45,43)	37,31 (22,89-51,73)	
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>					
Donante AA/ Receptor AA	7,69 (0,41-30,28)	7,69 (0,41-30,28)	7,69 (0,41-30,28)	7,69 (0,41-30,28)	0,183
Donante AB/ Receptor AA	14,29 (2,10-37,51)	14,29 (2,10-37,51)	22,14 (4,85-47,20)	22,14 (4,85-47,20)	
Donante AB/ Receptor AB	21,27 (12,30-31,88)	27,48 (17,25-38,69)	34,03 (22,68-45,69)	43,04 (27,04-58,07)	
Donante AA/ Receptor AB	10,53 (1,66-29,02)	21,05 (6,25-41,65)	26,32 (9,17-47,43)	26,32 (9,17-47,43)	
<b>Genotipo KIR Donante</b>					
AA	9,38 (2,33-22,53)	15,63 (5,58-30,30)	18,75 (7,46-33,97)	18,75 (7,46-33,97)	0,131
Bx(AB+BB)	19,81 (11,92-29,16)	24,87 (16-34,76)	31,57 (21,59-42,02)	38,32 (25,36-51,15)	
<b>B-content score Donante</b>					
0	9,38 (2,33-22,53)	15,63 (5,58-30,30)	18,75 (7,46-33,97)	18,45 (7,46-33,97)	0,016
1	13,16 (4,73-25,98)	13,16 (4,73-25,98)	18,60 (8,05-32,53)	25,60 (10,17-44,39)	
2+3+4	25,65 (13,68-39,44)	35,34 (21,24-49,75)	43,10 (27,59-57,68)	50,47 (29,72-68,02)	
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>					
Neutral	11,43 (5,31-20,15)	14,29 (7,29-23,56)	18,65 (10,49-28,62)	23,03 (12,11-36,01)	0,016
Better	20,83 (7,36-38,95)	33,63 (15,58-52,79)	42,56 (22,05-61,71)	52,38 (24,94-74,00)	
Best	31,98 (12,52-53,50)	37,65 (16,17-59,24)	43,32 (19,99-64,74)	43,32 (19,99-64,74)	



VARIABLES	MNRR				p value
	3 meses	6 meses	12 meses	29 meses	
	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	IA % (I.C. 95%)	
<b>Genotipo KIR receptor</b>					
AA	11,11 (2,72-26,21) 18,64 (11,20-27,55)	11,11 (2,72-26,21) 25,73 (16,98-35,38)	14,98 (4,56-31,14) 31,85 (22,18-41,94)	14,98 (4,56-31,14) 39,81 (25,79-53,47)	0,059
<b>Profylaxis EICR</b>					
ICN + MMF	16,44 (8,99-25,85)	20,55 (12,14-30,51)	26,09 (16,59-36,60)	33,79 (20,18-47,92)	0,740
Otros (ICN aislada o ICN+Sirolimus + MMF)	17,50 (7,59-30,78)	25,52 (13,06-39,99)	31,18 (17,20-46,23)	31,18 (17,20-46,23)	
<b>Régimen de acondicionamiento</b>					
Intensidad reducida	17,55 (10,11-26,69)	23,96 (15,20-33,85)	32,05 (21,93-42,59)	38,60 (25,70-51,33)	0,133
Mieloablativo	15,15 (5,42-29,48)	18,18 (7,24-33,06)	18,18 (7,24-33,06)	18,18 (7,24-33,06)	
<b>Fuente de progenitores</b>					
Sangre periférica	19,19 (12,10-27,52)	23,23 (15,44-31,97)	27,38 (18,96-36,47)	32,33 (21,93-43,17)	0,990
Médula ósea	0,00 (NaN-NaN)	16,08 (2,27-41,40)	33,92 (9,29-61,14)	NA (NA-NA)	

### Análisis univariable: SLE

Variables	SLE (29 meses)	
	Absoluto (%)	Hazard Ratio (IC 95%), p value
<b>Edad receptor, años</b>		
≤39 años	21 (18,6)	1
40-59 años	40 (35,4)	1,15 (0,51-2,55, p=0,740)
>60 años	52 (46,0)	1,17 (0,55-2,52, p=0,679)
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>		
≤59 años	61 (54,0)	1
≥60 años	52 (46,0)	1,07 (0,64-1,79, p=0,801)
<b>Sexo receptor</b>		
Mujer	49 (43,4)	1
Varón	64 (56,6)	1,24 (0,71-2,16, p=0,449)
<b>Enfermedad de base (dos grupos)</b>		
LA y patología mieloide	79 (69,9)	1
Patología linfoide y otros	34 (30,1)	0,93 (0,51-1,70, p=0,818)
<b>LMA vs. resto</b>		
LMA	35 (31,0)	1
Distinto de LMA	78 (69,0)	1,46 (0,79-2,71, p=0,224)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	44 (38,9)	1
Estadio intermedio	54 (47,8)	1,26 (0,67-2,39, p=0,474)
Estadio avanzado	15 (13,3)	3,91 (1,85-8,24, p<0,001)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>		
Remisión completa	51 (45,1)	1
Remisión parcial	35 (31,0)	0,75 (0,36-1,55, p=0,441)
Enfermedad activa	27 (23,9)	2,16 (1,16-4,00, p=0,015)
<b>Remisión completa</b>		
Sí	51 (45,1)	1
No	62 (54,9)	1,07 (0,64-1,78, p=0,790)
<b>Trasplante previo</b>		
No TPH previo	40 (40,8)	1
Sí TPH previo	58 (59,2)	1,29 (0,68-2,42, p=0,437)
<b>CMV estado serológico D/R</b>		
D-/R+	24 (21,2)	1
Resto (+/+; +/-; -/-)	89 (78,8)	0,56 (0,30-1,04, p=0,065)
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>		
Isogrupo	75 (66,4)	1
Menor	21 (18,6)	0,66 (0,34-1,31, p=0,235)
Mayor+Bidireccional	17 (15,0)	0,60 (0,29-1,25, p=0,172)
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>		
No	17 (15,0)	1
Sí	96 (85,0)	1,29 (0,58-2,87, p=0,528)
<b>Donante varón</b>		
No (Mujer)	33 (29,2)	1

Sí (Varón)	80 (70,8)	0,60 (0,34-1,06, p=0,078)
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>		
Receptor varón-donante mujer	10 (8,8)	1
Otros	103 (91,2)	0,62 (0,27-1,46, p=0,276)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>		
No	43 (38,1)	1
Sí	70 (61,9)	1,09 (0,62-1,92, p=0,762)
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>		
0 o 1	26 (23,0)	1
2 o 3	87 (77,0)	1,36 (0,70-2,65, p=0,366)
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>		
Hijo/a	69 (61,1)	1
Hermano/a+Progenitores+otros	44 (38,9)	0,94 (0,55-1,60, p=0,809)
<b>Parentesco donante</b>		
Hijo/a	69 (61,1)	1
Hermano/a	32 (28,3)	1,20 (0,66-2,20, p=0,551)
Progenitores+otros	12 (10,6)	1,04 (0,41-2,69, p=0,928)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>HvG</i> (A, B, C, <i>DRB1</i>, <i>DQB1</i>)</b>		
5/10	65 (57,5)	1
≥6/10	48 (42,5)	1,03 (0,60-1,79, p=0,907)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>GvH</i> (A, B, C, <i>DRB1</i>, <i>DQB1</i>)</b>		
5/10	61 (54,0)	1
≥6/10	52 (46,0)	1,55 (0,90-2,68, p=0,113)
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>		
No	73 (64,6)	1
Sí	40 (35,4)	0,61 (0,33-1,12, p=0,111)
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>		
No	19 (16,8)	1
Sí	94 (83,2)	0,77 (0,39-1,53, p=0,454)
<b>Ausencia de ligando KIR en receptor</b>		
No	39 (34,5)	1
Sí	74 (65,5)	0,77 (0,44-1,33, p=0,346)
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>		
No	42 (37,2)	1
Sí	71 (62,8)	1,15 (0,65-2,02, p=0,632)
<b>Grupo KIR B donante (Stanford)</b>		
No (Neutral)	70 (61,9)	1
Sí (Better+ Best)	43 (38,1)	1,91 (1,10-3,31, p=0,021)
<b>Centrómero donante</b>		
AA	52 (46,0)	1
AB	42 (37,2)	1,01 (0,55-1,88, p=0,970)

<b>BB</b>	19 (16,8)	1,76 (0,85-3,62, p=0,127)
<b>Telómero donante</b>		
AA	67 (59,3)	1
AB	41 (36,3)	1,37 (0,77-2,43, p=0,286)
BB	5 (4,4)	4,36 (1,50-12,65, p=0,007)
<b>Gen 2DS2 en donante</b>		
No	56 (49,6)	1
Sí	57 (50,4)	1,37 (0,79-2,36, p=0,265)
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>		
Donante AA/ Receptor AA	13 (11,6)	1
Donante AB/ Receptor AA	14 (12,5)	2,00 (0,48-8,38, p=0,344)
Donante AB/ Receptor AB	66 (58,9)	3,34 (1,02-10,93, p=0,046)
Donante AA/ Receptor AB	19 (17,0)	2,66 (0,72-9,88, p=0,144)
<b>Genotipo KIR Donante</b>		
AA	32 (28,3)	1
Bx(AB+BB)	81 (71,7)	0,98 (0,56-1,71, p=0,940)
<b>B-content score Donante</b>		
0	32 (28,3)	1
1	38 (33,6)	1,20 (0,57-2,53, p=0,638)
2+3+4	43 (38,1)	2,11 (1,05-4,24, p=0,036)
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>		
Neutral	70 (61,9)	1
Better	24 (21,2)	1,81 (0,94-3,51, p=0,077)
Best	19 (16,8)	2,05 (1,01-4,14, p=0,046)
<b>Genotipo KIR receptor</b>		
AA	27 (23,9)	1
Bx(AB+BB)	86 (76,1)	2,16 (1,01-4,60, p=0,047)
<b>B-content score Receptor</b>		
0	27 (23,9)	1
1	55 (48,7)	1,94 (0,88-4,28, p=0,099)
2+3+4	31 (27,4)	2,70 (1,14-6,37, p=0,024)
<b>Profilaxis EICR</b>		
ICN + MMF	73 (64,6)	1
Otros (ICN aislada o ICN+Sirolimus + MMF)	40 (35,4)	0,96 (0,54-1,72, p=0,896)
<b>Régimen de acondicionamiento</b>		
Intensidad reducida	80 (70,8)	1
Mieloablativo	33 (29,2)	1,16 (0,65-2,07, p=0,617)
<b>Fuente de progenitores</b>		
Sangre periférica	99 (87,6)	1
Médula ósea	14 (12,4)	0,62 (0,22-1,71, p=0,354)
<b>Fallo de injerto primario</b>		
No	108 (95,6)	1
Sí	5 (4,4)	3,09 (1,23-7,81, p=0,017)
<b>Fallo de injerto primario en neutrófilos</b>		
No	108 (95,6)	1

<b>Sí</b>	5 (4,4)	3,09 (1,23-7,81, p=0,017)
<b>Fallo de injerto primario en plaquetas</b>		
<b>No</b>	49 (43,4)	1
<b>Sí</b>	64 (56,6)	2,44 (1,34-4,46, p=0,004)
<b>Injerto neutrófilos mayor <math>0,5 \times 10^3</math></b>		
<b>No</b>	7 (6,2)	1
<b>Sí</b>	106 (93,8)	0,16 (0,06-0,39, p<0,001)
<b>Injerto plaquetas mayor <math>20 \times 10^9</math></b>		
<b>No</b>	19 (16,8)	1
<b>Sí</b>	94 (83,2)	0,07 (0,03-0,14, p<0,001)
<b>Fiebre alorreactiva</b>		
<b>No</b>	42 (37,2)	1
<b>Sí</b>	58 (51,3)	0,87 (0,51-1,48, p=0,599)

### Análisis univariable: SG

Variables	SG (29 meses)	
	Absoluto (%)	Hazard Ratio (IC 95%), p value
<b>Edad receptor, años</b>		
≤39 años	21 (18,6)	1
40-59 años	40 (35,4)	0,90 (0,37-2,17, p=0,811)
>60 años	52 (46,0)	1,31 (0,59-2,91, p=0,514)
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>		
≤59 años	61 (54)	1
≥60 años	52 (46,0)	1,40 (0,78-2,51, p=0,264)
<b>Sexo receptor</b>		
Mujer	49 (43,4)	1
Varón	64 (56,6)	1,22 (0,67-2,22, p=0,508)
<b>Enfermedad de base (dos grupos)</b>		
LA y patología mieloide	79 (69,9)	1
Patología linfoide y otros	34 (30,1)	1,18 (0,63-2,19, p=0,608)
<b>LMA vs. resto</b>		
LMA	35 (31,0)	1
Distinto de LMA	78 (69,0)	1,42 (0,73-2,76, p=0,295)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	44 (38,9)	1
Estadio intermedio	54 (47,8)	1,60 (0,79-3,24, p=0,189)
Estadio avanzado	15 (13,3)	3,94 (1,72-9,03, p=0,001)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>		
Remisión completa	51 (45,1)	1
Remisión parcial	35 (31,0)	0,96 (0,45-2,03, p=0,912)
Enfermedad activa	27 (23,9)	2,16 (1,09-4,26, p=0,026)
<b>Remisión completa</b>		
Sí	51 (45,1)	1
No	62 (54,9)	1,43 (0,78-2,59, p=0,245)
<b>Trasplante previo</b>		
No TPH previo	40 (40,8)	1
Sí TPH previo	58 (59,2)	1,13 (0,58-2,19, p=0,729)
<b>CMV estado serológico D/R</b>		
D-/R+	24 (21,2)	1
Resto (+/+; +/-; -/-)	89 (78,8)	0,57 (0,29-1,10, p=0,095)
<b>R/D incompatibilidad grupo ABO</b>		
Isogrupo	75 (66,4)	1
Menor	21 (18,6)	0,90 (0,41-1,98, p=0,799)
Mayor+Bidireccional	17 (15,0)	0,94 (0,41-2,15, p=0,886)
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>		
No	17 (15,0)	1
Sí	96 (85,0)	0,96 (0,43-2,16, p=0,927)
<b>Donante varón</b>		
No (Mujer)	33 (29,2)	1

Sí (Varón)	80 (70,8)	0,65 (0,35-1,19, p=0,162)
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>		
Receptor varón-donante mujer	10 (8,8)	1
Otros	103 (91,2)	0,65 (0,26-1,66, p=0,371)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>		
No	43 (38,1)	1
Sí	70 (61,9)	0,91 (0,50-1,65, p=0,759)
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>		
0 o 1	26 (23,0)	1
2 o 3	87 (77,0)	0,65 (0,34-1,23, p=0,184)
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>		
Hijo/a	69 (61,1)	1
Hermano/a+Progenitores+otros	44 (38,9)	0,80 (0,48-1,34, p=0,399)
<b>Parentesco donante</b>		
Hijo/a	69 (61,1)	1
Hermano/a	32 (28,3)	1,26 (0,66-2,41, p=0,488)
Progenitores+otros	12 (10,6)	1,26 (0,48-3,28, p=0,640)
<b>Compatibilidad HLA dirección HVG (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	65 (57,5)	1
≥6/10	48 (42,5)	1,08 (0,60-1,95, p=0,803)
<b>Compatibilidad HLA dirección GvH (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	61 (54,0)	1
≥6/10	52 (46,0)	1,53 (0,85-2,75, p=0,157)
<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>		
No	73 (64,6)	1
Sí	40 (35,4)	0,55 (0,28-1,08, p=0,081)
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>		
No	19 (16,8)	1
Sí	94 (83,2)	0,82 (0,38-1,77, p=0,620)
<b>Ausencia de ligando KIR en receptor</b>		
No	39 (34,5)	1
Sí	74 (65,5)	0,67 (0,37-1,22, p=0,191)
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>		
No	42 (37,2)	1
Sí	71 (62,8)	1,47 (0,78-2,77, p=0,231)
<b>Grupo KIR B donante (Stanford)</b>		
No (Neutral)	70 (61,9)	1
Sí (Better+ Best)	43 (38,1)	2,57 (1,42-4,65, p=0,002)
<b>Centrómero donante</b>		
AA	52 (46,0)	1
AB	42 (37,2)	0,86 (0,44-1,71, p=0,676)

<b>BB</b>	19 (16,8)	1,91 (0,91-4,01, p=0,086)
<b>Telómero donante</b>		
AA	67 (59,3)	1
AB	41 (36,3)	1,61 (0,86-2,99, p=0,133)
BB	5 (4,4)	5,21 (1,76-15,36, p=0,003)
<b>Gen 2DS2 en donante</b>		
No	56 (49,6)	1
Sí	57 (50,4)	1,39 (0,77-2,52, p=0,270)
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>		
Donante AA/ Receptor AA	13 (11,6)	1
Donante AB/ Receptor AA	14 (12,5)	1,77 (0,29-10,60, p=0,533)
Donante AB/ Receptor AB	66 (58,9)	4,45 (1,06-18,71, p=0,041)
Donante AA/ Receptor AB	19 (17,0)	4,08 (0,88-18,97, p=0,073)
<b>Genotipo KIR Donante</b>		
AA	32 (28,3)	1
Bx(AB+BB)	81 (71,7)	1,47 (0,74-2,91, p=0,269)
<b>B-content score Donante</b>		
0	32 (28,3)	1
1	38 (33,6)	0,80 (0,34-1,88, p=0,609)
2+3+4	43 (38,1)	2,30 (1,12-4,72, p=0,024)
<b>Grupo KIR B donante(Stanford)</b>		
Neutral	70 (61,9)	1
Better	24 (21,2)	2,50 (1,25-5,02, p=0,010)
Best	19 (16,8)	2,66 (1,28-5,56, p=0,009)
<b>Genotipo KIR receptor</b>		
AA	27 (23,9)	1
Bx(AB+BB)	86 (76,1)	3,18 (1,25-8,09, p=0,015)
<b>B-content score Receptor</b>		
0	27 (23,9)	1
1	55 (48,7)	2,91 (1,12-7,61, p=0,029)
2+3+4	31 (27,4)	3,87 (1,38-10,87, p=0,010)
<b>Profilaxis EICR</b>		
ICN + MMF	73 (64,6)	1
Otros (ICN aislada o ICN+Sirolimus + MMF)	40 (35,4)	0,99 (0,53-1,84, p=0,968)
<b>Régimen de acondicionamiento</b>		
Intensidad reducida	80 (70,8)	1
Mieloablatoivo	33 (29,2)	0,72 (0,36-1,41, p=0,334)
<b>Fuente de progenitores</b>		
Sangre periférica	99 (87,6)	1
Médula ósea	14 (12,4)	0,77 (0,27-2,15, p=0,612)
<b>Fallo de injerto primario mieloide</b>		
No	108 (95,6)	1
Sí	5 (4,4)	3,66 (1,43-9,33, p=0,007)



<b>Fallo de injerto primario en plaquetas</b>		
No	49 (43,4)	1
Sí	64 (56,6)	2,98 (1,50-5,88, p=0,002)
<b>Injerto neutrófilos mayor <math>0,5 \times 10^3</math></b>		
No	7 (6,2)	1
Sí	106 (93,8)	0,13 (0,05-0,33, p<0,001)
<b>Injerto plaquetas mayor <math>20 \times 10^9</math></b>		
No	19 (16,8)	1
Sí	94 (83,2)	0,05 (0,02-0,11, p<0,001)

### Análisis univariable (subestudio LMA): MNRR

Variables	MNRR	
	Absoluto (%)	Hazard Ratio(IC 95%), p value
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>		
≤59 años	17 (48,6)	1
≥60 años	18 (51,4)	1,26 (0,56-2,85, p = 0,580)
<b>Sexo receptor</b>		
Mujer	15 (42,9)	1
Varón	20 (57,1)	1,09 (0,48-2,48, p = 0,830)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	21 (60,0)	1
Estadio intermedio	12 (34,3)	1,05 (0,46-2,40, p = 0,910)
Estadio avanzado	2 (5,7)	0,00 (0,00-0,00, p <0,001)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>		
Remisión completa	22 (62,9)	-
Remisión parcial	11 (31,4)	2,38 (1,00-5,65, p = 0,049)
Enfermedad activa	2 (5,7)	0,00 (0,00-0,00, p <0,001)
<b>Remisión completa</b>		
Sí	22 (62,9)	1
No	13 (37,1)	1,69 (0,72-3,96, p = 0,230)
<b>Grupo ABO compatible D/R</b>		
No	12 (34,3)	1
Sí	23 (65,7)	1,93 (0,83-4,48, p = 0,130)
<b>Donante varón</b>		
No (Mujer)	7 (20,0)	1
Sí (Varón)	28 (80,0)	1,08 (0,38-3,07, p = 0,890)
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>		
Receptor varón-donante mujer	3 (8,6)	1
Otros	32 (91,4)	0,77 (0,19-3,21, p = 0,720)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>		
No	13 (37,1)	1
Sí	22 (62,9)	1,07 (0,42-2,74, p = 0,890)
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>		
0 o 1	6 (17,1)	1
2 o 3	29 (82,9)	2,14 (0,42-10,92, p = 0,360)
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>		
Hijo/a	23 (65,7)	1
Hermano/a+Progenitores+otros	12 (34,3)	1,11 (0,44-2,77, p = 0,830)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>HvG</i> (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	20 (57,1)	1
≥6/10	15 (42,9)	1,25 (0,55-2,82, p = 0,590)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>GvH</i> (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	17 (48,6)	1
≥6/10	18 (51,4)	0,88 (0,38-2,00, p=0,750)

<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>		
No	24 (68,6)	1
Sí	11 (31,4)	1,02 (0,44-2,35, p=0,960)
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>		
No	3 (8,6)	1
Sí	32 (91,4)	2,60 (0,44-15,45, p=0,290)
<b>Ausencia de ligando KIR en receptor</b>		
No	12 (34,3)	1
Sí	23 (65,7)	0,70 (0,29-1,66, p=0,410)
<b>Incompatibilidad_ligandoKIR_direcc_HvG</b>		
No	12 (34,3)	1
Sí	23 (65,7)	1,64 (0,69-3,93, p=0,260)
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>		
No	15 (42,9)	20 (57,1)
Sí		1,09 (0,48-2,46, p=0,840)
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>		
No (Neutral)	24 (68,6)	1
Sí (Better+ Best)	11 (31,4)	1,37 (0,54-3,47, p=0,510)
<b>Centrómero donante</b>		
AA	52 (46,0)	1
AB	42 (37,2)	1,01 (0,55-1,88, p=0,970)
BB	19 (16,8)	1,76 (0,85-3,62, p=0,127)
<b>Telómero donante</b>		
AA	22 (62,9)	1
AB	12 (34,3)	1,03 (0,42-2,50, p=0,960)
BB	1 (2,9)	8,12 (2,82-23,32, p<0,001)
<b>Gen 2DS2 en donante</b>		
No	18 (51,4)	1
Sí	17 (48,6)	1,74 (0,76-3,98, p=0,190)
<b>Genotipo KIR Donante</b>		
AA	12 (34,3)	1
Bx(AB+BB)	23 (65,7)	1,47 (0,59-3,66, p=0,410)
<b>B-content score Donante</b>		
0	12 (34,3)	1
1	12 (34,3)	1,36 (0,51-3,62, p=0,530)
2+3+4	11 (31,4)	1,62 (0,53-4,91, p=0,400)
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>		
Neutral	24 (68,6)	1
Better	6 (17,1)	1,42 (0,46-4,37, p=0,540)
Best	5 (14,3)	1,30 (0,34-5,03, p=0,700)
<b>Genotipo KIR receptor</b>		
AA	10 (28,6)	1
Bx(AB+BB)	25 (71,4)	0,41 (0,19-0,91, p=0,029)
<b>B-content score Receptor</b>		
0	10 (28,6)	1

<b>1</b>	15 (42,9)	0,46 (0,19-1,09, p=0,076)
<b>2+3+4</b>	10 (28,6)	0,34 (0,10-1,15, p=0,083)
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>		
<b>Donante AA/ Receptor AA</b>	6 (17,6)	1
<b>Donante AB/ Receptor AA</b>	4 (11,8)	1,28 (0,51-3,20, p=0,600)
<b>Donante AB/ Receptor AB</b>	18 (52,9)	0,54 (0,20-1,47, p=0,220)
<b>Donante AA/ Receptor AB</b>	6 (17,6)	0,12 (0,01-1,16, p=0,068)

## Análisis univariable (subestudio LMA): SLE

Variables	SLE	
	Absoluto (%)	Hazard Ratio (IC 95%), p value
<b>Edad receptor, años (dos grupos)</b>		
≤59 años	17 (48,6)	1
≥60 años	18 (51,4)	1,92 (0,81-4,56, p = 0,140)
<b>Sexo receptor</b>		
Mujer	15 (42,9)	1
Varón	20 (57,1)	1,03 (0,42-2,57, p = 0,942)
<b>Estadio enfermedad pretrasplante</b>		
Estadio precoz	21 (60,0)	1
Estadio intermedio	12 (34,3)	0,98 (0,40-2,37, p = 0,961)
Estadio avanzado	2 (5,7)	0,00 (0,00-Inf, p=0.998)
<b>Situación enfermedad pretrasplante</b>		
Remisión completa	22 (62,9)	1
Remisión parcial	11 (31,4)	2,27 (0,91-5,65, p = 0,079)
Enfermedad activa	2 (5,7)	0,00 (0,00-Inf, p=0.998)
<b>Remisión completa</b>		
Sí	22 (62,9)	1
No	13 (37,1)	2,24 (0,90-5,59, p = 0,083)
<b>Donante varón</b>		
No (Mujer)	7 (20,0)	1
Sí (Varón)	28 (80,0)	0,68 (0,21-2,13, p = 0,504)
<b>Compatibilidad sexo donante-receptor</b>		
Receptor varón-donante mujer	3 (8,6)	1
Otros	32 (91,4)	0,59 (0,13-2,68, p = 0,495)
<b>Edad donante &lt;40 años</b>		
No	13 (37,1)	1
Sí	22 (62,9)	0,66 (0,26-1,68, p = 0,388)
<b>Criterios Ciurea cumplidos en la selección del donante</b>		
0 o 1	6 (17,1)	1
2 o 3	29 (82,9)	0,25 (0,05-1,32, p = 0,104)
<b>Parentesco donante (dos grupos)</b>		
Hijo/a	23 (65,7)	1
Hermano/a+Progenitores+otros	12 (34,3)	1,67 (0,64-4,34, p = 0,292)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>HvG</i> (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	20 (57,1)	1
≥6/10	15 (42,9)	0,89 (0,37-2,12, p = 0,795)
<b>Compatibilidad HLA dirección <i>GvH</i> (A, B, C, DRB1, DQB1)</b>		
5/10	17 (48,6)	1
≥6/10	18 (51,4)	1,16 (0,49-2,79, p = 0,733)

<b>Incompatibilidad ligando-ligando (Perugia)</b>		
No	24 (68,6)	1
Sí	11 (31,4)	0,87 (0,34-2,25, p = 0,781)
<b>Incompatibilidad receptor-ligando (Memphis)</b>		
No	3 (8,6)	1
Sí	32 (91,4)	2,00 (0,26-15,18, p = 0,503)
<b>Ausencia de ligando KIR en receptor</b>		
No	12 (34,3)	1
Sí	23 (65,7)	0,81 (0,33-1,97, p = 0,645)
<b>Incompatibilidad_ligandoKIR_direcc_HvG</b>		
No	12 (34,3)	1
Sí	23 (65,7)	1,30 (0,49-3,44, p = 0,603)
<b>Incompatibilidad KIR-KIR</b>		
No	15 (42,9)	1
Sí	20 (57,1)	1,37 (0,57-3,29, p = 0,476)
<b>Grupo KIR B donante (Standford)</b>		
No (Neutral)	24 (68,6)	1
Sí (Better+ Best)	11 (31,4)	2,59 (0,99-6,81, p = 0,053)
<b>Centrómero donante</b>		
AA	52 (46,0)	1
AB	42 (37,2)	0,71 (0,26-1,99, p = 0,517)
BB	19 (16,8)	3,07 (0,77-12,34, p = 0,114)
<b>Telómero donante</b>		
AA	22 (62,9)	1
AB	12 (34,3)	1,46 (0,55-3,87, p = 0,442)
BB	1 (2,9)	7,81 (0,83-73,21, p = 0,072)
<b>Gen 2DS2 en donante</b>		
No	18 (51,4)	1
Sí	17 (48,6)	1,10 (0,43-2,78, p = 0,841)
<b>Genotipo KIR Donante</b>		
AA	12 (34,3)	1
Bx(AB+BB)	23 (65,7)	0,90 (0,34-2,39, p = 0,836)
<b>B-content score Donante</b>		
0	12 (34,3)	1
1	12 (34,3)	0,56 (0,18-1,76, p = 0,323)
2+3+4	11 (31,4)	1,88 (0,61-5,73, p = 0,270)
<b>Grupo KIR B donante(Standford)</b>		
Neutral	24 (68,6)	1
Better	6 (17,1)	2,08 (0,65-6,59, p = 0,216)
Best	5 (14,3)	4,08 (1,03-16,16, p = 0,045)
<b>Genotipo KIR receptor</b>		
AA	10 (28,6)	1
Bx(AB+BB)	25 (71,4)	1,02 (0,40-2,62, p = 0,968)
<b>B-content score Receptor</b>		
0	10 (28,6)	1
1	15 (42,9)	0,79 (0,27-2,29, p = 0,661)

<b>2+3+4</b>	10 (28,6)	1,91 (0,54-6,71, p = 0,316)
<b>Compatibilidad genotipo KIR donante/receptor</b>		
<b>Donante AA/ Receptor AA</b>	6 (17,6)	1
<b>Donante AB/ Receptor AA</b>	4 (11,8)	0,82 (0,21-3,15, p = 0,775)
<b>Donante AB/ Receptor AB</b>	18 (52,9)	0,86 (0,28-2,68, p = 0,796)
<b>Donante AA/ Receptor AB</b>	6 (17,6)	1,08 (0,11-10,51, p = 0,945)

