

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**LIVIA CAROLINE MARIANO COMPTE**

**Estudo da genotipagem KIR por sequenciamento de nova geração em  
doadores HLA compatíveis e o impacto nos desfechos pós-transplante  
de células-tronco hematopoiéticas**

São Paulo  
2023



**LIVIA CAROLINE MARIANO COMPTE**

**Estudo da genotipagem KIR por sequenciamento de nova geração em doadores HLA compatíveis e o impacto nos desfechos pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas**

**Versão Corrigida**

**(Versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMUSP)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Vanderson Rocha

São Paulo  
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Compte, Livia Caroline Mariano

Estudo da genotipagem KIR por sequenciamento de nova geração em doadores HLA compatíveis e o impacto nos desfechos pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas / Livia Caroline Mariano Compte. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de  
Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,  
Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Vanderson Geraldo Rocha.

Descritores: 1.Receptores de células matadoras naturais tipo imunoglobulina 2.Células matadoras naturais 3.Transplante de células-tronco hematopoiéticas 4.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 5.Seleção de doador 6.Neoplasias hematológicas

USP/EM/DBD- 377/23/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Para Isabela e Sofia*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Vanderson Rocha**, pelos desafios e ensinamentos durante essa jornada.

Ao Professor **Marcelo Fernandez-Vina**, que me acolheu em Stanford e, com a generosidade de poucos, me guiou ao longo desses anos na compreensão da imunogenética do transplante de células-tronco.

Ao Doutor **Roberto Lowsky**, que apoiou, prontamente, a ideia dessa pesquisa e foi fundamental para a base de dados clínicos.

Ao **Paul Norman**, não tivemos contato direto, mas, a partir de uma rápida ligação, cedeu o material necessário para a realização do projeto.

A todos do Laboratório de HLA da *Stanford University*, em especial, ao **Gonzalo Montero**, grande parceiro nesse projeto desafiador.

À equipe da University of California, San Francisco, em especial, **Danillo e Leonardo**, que me auxiliaram na leitura da tipificação e classificação dos genótipos.

À banca de qualificação: Professor **Eduardo Rego**, Professora **Carmem Bonfim** e Professora Dra. **Jeane Eliete Laguilá Visentainer**, pelos conselhos que contribuíram para a lapidação dessa tese.

Aos colegas e amigos do centro de transplante do HCFMUSP, em especial, **Priscila, Giancarlo, Leonardo, Bruna e Kelly**. Sem eles, teria sido impossível conciliar a coordenação do serviço de transplante em tempos tão adversos com a pós-graduação.

Às amigas-irmãs **Amanda, Diana, Carolina e Carla**, por todos os momentos de acolhida e suporte nesses anos tão intensos.

Aos meus pais, **Humberto e Graça**, por terem formado a base dos meus valores e me mostrarem a importância de servir para o bem de todos.

Aos meus queridos irmãos **Stefanie e Alexandre**, pela certeza de sempre podermos contar um com o outro.

Ao meu esposo **Marcelo**, amigo, companheiro de vida e meu porto seguro.

Aos meus filhos, que me fazem querer ser melhor todos os dias: **Isabela**, concebida ao mesmo tempo que a ideia desse projeto e minha luz desde então; **Ben**, que, logo antes da qualificação dessa tese, cumpriu sua missão e me aguarda na eternidade; e **Sofia**, minha doçura e aconchego.

A Deus, pela dádiva da vida, pelo dom da fé e por guiar minha vida.

*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos se a tivéssemos. O perfeito é o desumano porque o humano é imperfeito<sup>1</sup>.”*

**Fernando Pessoa**

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP*; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Maria Claudia Pestana; Maria Cristina Cavarette Dziabas; Eliana Maria Garcia; Maria Fatima dos Santos, Maria Marta Nascimento; Suely Campos Cardoso. 3a ed. ed. amp. mod. São Paulo: SIBI/USP. 2016. (Caderno de estudos).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.



## RESUMO

Compte LCM. Estudo da genotipagem KIR por sequenciamento de nova geração em doadores HLA compatíveis e o impacto nos desfechos pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O transplante de células-tronco hematopoiética alogênico (aloTCTH) é uma opção curativa para diversas neoplasias hematológicas, porém a recaída ainda é um desafio. Células natural killer (NK) mediam a resposta imune inata e tem uma contribuição importante no efeito enxerto *versus* leucemia. O impacto das células NK por meio da interação entre os seus receptores e respectivos ligantes nos desfechos do aloTCTH tem sido estudado por diferentes modelos baseados na genotipagem dos genes dos receptores imunoglobulina-*like* (KIR) e dos antígenos leucocitários humano (HLA), entretanto os dados são controversos. Nosso objetivo foi avaliar o impacto da genotipagem KIR de doadores usando o sequenciamento de nova geração em desfechos pós-aloTCTH não mieloablativo (NMA). **Métodos:** foram avaliados 343 pacientes adultos com neoplasias hematológicas submetidos a aloTCTH com regime de condicionamento não mieloablativo TLI-ATG de doadores HLA compatíveis aparentados e não aparentados (10/10) entre 2007 e 2017. A genotipagem KIR foi realizada usando sequenciamento de nova geração e a pipeline PING. O desfecho primário foi recaída em 2 anos; desfechos secundários foram sobrevida global (SG), mortalidade não relacionada à recaída (MNR), doença do enxerto contra o hospedeiro aguda grau II-IV (DECHa) e crônica (DECHc). **Resultados:** A idade mediana foi de 61 anos (22-77y) e 57,7% eram do sexo masculino. Leucemia mieloide aguda (N=108) foi o diagnóstico mais frequente, correspondendo a 60% das neoplasias mieloides (N=180), seguida por linfoma não Hodgkin (N=96), síndrome mielodisplásica (N=72), leucemia linfocítica crônica (N=46) e linfoma de Hodgkin (N=21). A mediana de seguimento foi de 7 anos (IC 95% 6,1-7,8). A incidência acumulada de recaída em 2 anos foi 45,2% (IC 95%, 40,2-50,8), DECH aguda grau II-IV e crônica foram 12,8% (IC 95%, 9,7-16,9) e 32,1% (IC 95%, 27,5-37,4), respectivamente. Sobrevida global e sobrevida livre de progressão estimadas em 2 anos foram 62,7% (IC 95%, 57,3-67,6) e 50,6% (IC 95%, 45,1-55,9). O genótipo *KIR* não teve associação com incidência acumulativa de recaída, SG, MNR, DECHa grau II-IV e DECHc. O número de cópias dos genes *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4*, *KIR3DS1* e *KIR3DL1* não teve associação com recaída pós- transplante. Nas doenças mieloides, o par doador-receptor com interação inibitória fraca pelo modelo *KIR3DL1/Bw4* e o *score* KIR inibitório funcional modificado  $\geq 2$  foram associados com menor SG, mas não houve significância estatística no modelo de regressão multivariada (mCF\_KIR *score*: HR, 1,41 IC 95% 0,97-2,05,  $p=0,07$ ). Na doença linfóide, o modelo receptor ligante foi um preditor independente de recaída (HR, 1,72 IC 95% 1,02 – 2,92,  $p=0,04$ ). Entre os dois alelos mais comuns de *KIR2DL2*, a presença do alelo *KIR2DL2\*001* resultou numa maior incidência de recaída quando comparado a *KIR2DL2\*003* (HR, 2,07 IC 95% 1,02-4,18,  $p=0,04$ ). Os alelos mais comuns de *KIR3DL1*, *KIR2DL3* e *KIR2DS1* não foram associados à recaída e sobrevida global. **Conclusão:** Neste estudo retrospectivo em adultos

submetidos a aloTCTH com doadores HLA compatíveis e condicionamento NMA associado com ATG, o *score* CF-iKIR modificado mostrou tendência de associação com sobrevida global para as doenças mieloides e o modelo receptor ligante esteve associado ao risco de recaída em doenças linfoides. Estudos utilizando NGS em coortes maiores ainda são necessários para definir como a genotipagem *KIR* deve ser incorporada nos algoritmos de seleção de doador.

**Palavras-chave:** Receptores de células matadoras naturais tipo imunoglobulina. Células matadoras naturais. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. Seleção de doador. Neoplasias hematológicas.

## ABSTRACT

Compte LCM. KIR genotyping by next generation sequencing in HLA-matched related and unrelated donors and the impact in outcomes after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a curative option for several hematologic neoplasms, but relapse is still a challenge. Natural killer (NK) cells mediate early innate immune response and have an important contribution to graft versus leukemia effect. The impact of NK cells through receptors and ligands interaction in alloHSCT outcomes have been studied by different models based on killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and human leukocyte antigen (HLA) genotyping and data keeps controversy. Our aim was to evaluate the impact of donor KIR genotyping using NGS technology in outcomes after nonmyeloablative alloHSCT. **Methods:** 343 adult patients underwent alloHSCT with TLI-ATG non-myeloablative conditioning regimen for hematologic neoplasms from a matched related and unrelated donor between 2007 and 2017. Donor KIR genotyping was performed using next generation sequencing and PING pipeline. Primary endpoint was relapse in 2 years; secondary endpoints were overall survival (OS), nonrelapse mortality (NRM), grade II-IV acute and chronic graft versus host disease (GVHD). **Results:** The median age of the patients was 61 years (22-77y) and 57.7% were male. Acute myeloid leukemia (N=108) was the most frequent diagnosis, making up 60% of myeloid neoplasms (N=180), followed by non-Hodgkin lymphomas (N=96), myelodysplastic syndrome (N=72), chronic lymphocytic leukemia (N=46) and Hodgkin lymphoma (N=21). The median follow-up time was 7.0 years (95% CI, 6.1 – 7.8). The 2-year cumulative incidence of relapse was 45.2% (95% CI, 40.2-50.8), grade II to IV acute GVHD and chronic GVHD were 12.8% (95% CI, 9.7-16.9) and 32.1% (95% CI, 27.5-37.4), respectively. Estimate OS and PFS were 62.7% (95% CI, 57.3-67.6) and 50.6% (95% CI, 45.1-55.9) at 2 years. Donor *KIR* centromeric and telomeric genotype was not associated with relapse, OS, NRM, grade II-IV acute GVHD and chronic GVHD. Copy number of genes *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4*, *KIR3DS1* and *KIR3DL1* did not associated with relapse. For myeloid disease, weak inhibition pairs of *KIR3DL1/Bw4* model and a modified inhibitory *KIR* score  $\geq 2$  were associated with lower OS but were not statistically significant in a multivariate regression model (mCF\_*KIR* score: HR, 1.41 95% CI, 0.97-2.05,  $p=0.07$ ). For lymphoid disease, the missing ligand model was an independent predictor of relapse (HR, 1.72 95% CI, 1.02 – 2.92,  $p=0.04$ ). Among the most common *KIR2DL2* alleles, presence of *KIR2DL2\*001* resulted in a higher incidence of relapse compared to *KIR2DL2\*003* (HR, 2.07 95% CI, 1.02-4.18,  $p=0.04$ ). Different *KIR3DL1*, *KIR2DL3* and *KIR2DS1* most frequent alleles were not associated with differences in relapse and OS. **Conclusions:** In this retrospective study in adults undergoing alloHSCT with HLA-compatible donors and NMA conditioning associated with ATG, the modified CF-iKIR score showed an association trend with overall survival for myeloid diseases and the receptor-ligand model was associated with relapse risk in lymphoid

diseases. Studies using NGS in larger cohorts are still needed to define how KIR donor typing should be incorporated into donor selection algorithms.

**Keywords:** Receptors KIR. Killer cells, Natural. Hematopoietic stem cell transplantation. High-throughput Nucleotide Sequencing. Donor selection. Hematologic malignancies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Localização e estrutura do Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	22
<b>Figura 2</b> -	Receptores das células NK inibidores e ativadores, e seus respectivos ligantes .....	25
<b>Figura 3</b> -	Microambiente de interação das células NK.....	26
<b>Figura 4</b> -	Esquema do processo de educação das células NK .....	27
<b>Figura 5</b> -	Estrutura das proteínas KIR .....	28
<b>Figura 6</b> -	Nomenclatura dos genes <i>KIR</i> .....	30
<b>Figura 7</b> -	Organização genômica do cluster <i>KIR</i> localizado no cromossomo 19q13.4 dentro do complexo de receptores leucocitários .....	30
<b>Figura 8</b> -	Modelos de alorreatividade NK induzindo GVL pós-transplante.....	32
<b>Figura 9</b> -	Passos para a determinação do conteúdo gênico e alélico pela pipeline PING2.....	42
<b>Figura 10</b> -	Referência das estruturas dos haplótipos <i>KIR</i> .....	44
<b>Figura 11</b> -	Genótipos diferentes da estrutura <i>KIR</i> comum por deleções (DEL) ou duplicações (DUP) gênicas .....	45
<b>Figura 12</b> -	Genótipos que diferem da estrutura comum dos haplótipos <i>KIR</i> devido a duplicações e deleções no número de cópias dos genes .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Classificação dos alelos <i>KIR3DL1</i> .....	43
<b>Tabela 2</b> -	Classificação dos pares <i>KIR3DL1/Bw</i> .....	43
<b>Tabela 3</b> -	Interações do CF-KIR <i>Score</i> .....	46
<b>Tabela 4</b> -	Características clínicas da coorte .....	51
<b>Tabela 5</b> -	Distribuição dos subtipos <i>KIR3DL1</i> e HLA-B do doador .....	67
<b>Tabela 6</b> -	Análise univariada com os modelos KIR na população do estudo .....	69
<b>Tabela 7</b> -	Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo mieloide.....	72
<b>Tabela 8</b> -	Análise regressão multivariada para o desfecho sobrevida global no subgrupo mieloide.....	75
<b>Tabela 9</b> -	Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo linfoide.....	76
<b>Tabela 10</b> -	Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos KIR ligante-ligante e receptor ligante em desfechos no TCTH alogênico .....	82
<b>Tabela 11</b> -	Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos baseados na genotipagem KIR em desfechos no TCTH alogênico .....	84

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> -	Número de alelos, proteínas e genes nulos descritos de cada gene <i>KIR</i> , de acordo com IMGT .....	31
<b>Gráfico 2</b> -	Desfechos clínicos da coorte .....	52
<b>Gráfico 3</b> -	Desfechos clínicos de acordo com tipo de doador. ....	53
<b>Gráfico 4</b> -	Desfechos clínicos de acordo com grupo de doença.....	54
<b>Gráfico 5</b> -	Distribuição do número de cópias dos genes de cada região: centromérica e telomérica .....	55
<b>Gráfico 6</b> -	Número de alelos observados para cada gene <i>KIR</i> (resolução 3 dígitos).....	56
<b>Gráfico 7</b> -	Representação alélica dos genes <i>KIR</i> expressos em, pelo menos, 10 pacientes da coorte .....	57
<b>Gráfico 8</b> -	Classificação dos haplótipos dos doadores .....	58
<b>Gráfico 9</b> -	Frequência dos genótipos teloméricos e centroméricos .....	58
<b>Gráfico 10</b> -	Genótipo <i>KIR</i> centromérico dos doadores .....	59
<b>Gráfico 11</b> -	Impacto do genótipo <i>KIR</i> no desfecho recaída .....	61
<b>Gráfico 12</b> -	Incidência acumulada de recaída de acordo com subgrupo de doença .....	61
<b>Gráfico 13</b> -	Recaída por número de cópias dos genes.....	62
<b>Gráfico 14</b> -	Incidência de recaída de acordo com a presença do gene <i>KIR2DS1</i> (A) e pelo número de cópias (B) .....	63
<b>Gráfico 15</b> -	Incidência de recaída de acordo com a presença de <i>KIR2DS1</i> e os ligantes do grupo C.....	64
<b>Gráfico 16</b> -	Sobrevida global de acordo com grupo HLA-C .....	65
<b>Gráfico 17</b> -	Sobrevida global de acordo com o modelo <i>KIR2DS1</i> -grupo HLA-C .....	65
<b>Gráfico 18</b> -	Distribuição dos epítomos Bw .....	66
<b>Gráfico 19</b> -	Distribuição dos alelos <i>KIR</i> em alta resolução por haplótipo .....	67
<b>Gráfico 20</b> -	Incidência de recaída de acordo com o grau de interação entre <i>KIR3DL1</i> e HLA-B.....	68

<b>Gráfico 21</b> - Sobrevida global de acordo com modelo KIR3DL1/Bw4 .....	74
<b>Gráfico 22</b> - Sobrevida global de acordo com CF-KIR <i>score</i> modificado .....	74
<b>Gráfico 23</b> - Incidência acumulada de recaída no subgrupo linfóide de acordo com modelo KIR3DL1/Bw4.....	78



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 -</b>	Cálculo do IM-KIR <i>score</i> .....	46
-------------------	--------------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AlloHSCT	<i>Alogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i>
AlotCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico
AP	Aparentado
ATG	<i>Antithymocyte globulin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cen	Centromérico
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CMV	Citomegalovírus
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DECHc	Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRI	<i>Disease risk index</i>
EBMT	<i>European Bone Marrow Transplantation</i>
FACT	<i>Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy</i>
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
GVL	<i>Graft versus leukemia</i>
HCT-CI	<i>Comorbidity index – hematopoietic cell transplantation</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HL-A	<i>Human leukocyte-A</i>
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus type</i>
HVG	<i>Host versus graft</i>
IMGT	<i>International ImMunoGeneTics database</i>
IPD	<i>Immuno Polymorphism Database</i>
ITIM	<i>Immune tyrosine-based inhibitory motifs</i>
KIR	<i>Killer immunoglobulin like receptor</i>
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda

LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MNR	Mortalidade não relacionada
MRT	Mortalidade relacionada ao transplante
NAP	Não aparentado
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMDP	<i>National Marrow Donor Program</i>
NRM	<i>Non relapse mortality</i>
OS	<i>Overall survival</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PING	<i>Pushing Immunogenetics to the Next Generation</i>
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLE	Sobrevida livre de evento
SLP	Sobrevida livre de progressão
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSOP	<i>Sequence specific oligonucleotide probe</i>
TCD	<i>T cell depletion</i>
TCE	<i>T cell epitope</i>
TCR	<i>T cell replete</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
Tel	Telomérico
TLI	<i>Total Lymphocytic irradiation</i>
VHC	Vírus da hepatite C

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO.....	21
1.2	IMUNOGENÉTICA DO TCTH ALOGÊNICO .....	22
1.3	REGIME DE CONDICIONAMENTO TLI-ATG .....	24
1.4	CÉLULAS NK .....	25
1.5	OS RECEPTORES KIR.....	28
1.6	OS GENES <i>KIR</i> .....	29
1.7	MODELOS DE ALORREATIVIDADE KIR.....	32
1.8	JUSTIFICATIVA .....	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO.....	36
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	CARACTERÍSTICAS DO HOSPITAL E DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	38
3.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	38
3.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	38
3.4	PROTOCOLO DE TRANSPLANTE.....	38
3.5	DADOS CLÍNICOS .....	39
<b>3.5.1</b>	<b>Relacionados ao paciente .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Relacionados à doença de base .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Relacionados ao doador .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Relacionados à imunogenética doador/receptor .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Relacionados ao transplante .....</b>	<b>40</b>
3.6	DESFECHOS E DEFINIÇÕES.....	40
<b>3.6.1</b>	<b>Desfecho primário.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Desfechos secundários .....</b>	<b>41</b>
3.7	GENOTIPAGEM <i>KIR</i> .....	41
3.8	GENOTIPAGEM HLA .....	42
3.9	MODELOS DE ALORREATIVIDADE KIR.....	43
<b>3.9.1</b>	<b>Receptor-ligante: a presença do receptor KIR no doador de acordo com a presença do respectivo ligante HLA no paciente .....</b>	<b>43</b>
<b>3.9.2</b>	<b>KIR2DS1 - HLA-C .....</b>	<b>44</b>

3.9.3	<b>Haplótipos <i>KIR</i> do doador .....SUMÁRIO.....</b>	44
3.9.4	<b>Modelos combinados .....</b>	45
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
3.11	ASPECTOS ÉTICOS .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
4.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	50
4.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	50
4.2.1	<b>Desfechos de acordo com o tipo de doador.....</b>	53
4.2.2	<b>Desfechos de acordo com o grupo de doença .....</b>	54
4.3	GENOTIPAGEM <i>KIR</i> .....	55
4.3.1	<b>Número de cópias.....</b>	55
4.3.2	<b>Alelos <i>KIR</i>.....</b>	56
4.3.3	<b>Classificação genotípica.....</b>	57
4.4	CORRELAÇÃO DO GENÓTIPO COM OS DESFECHOS CLÍNICOS.....	60
4.5	AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE RECAÍDA POR NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>KIR</i> .....	62
4.6	MODELOS <i>KIR</i> .....	63
4.6.1	<b>Modelo <i>KIR2DS1</i> – HLA-C.....</b>	63
4.6.2	<b>Modelo <i>KIR3DL1</i> – BW4.....</b>	66
4.7	IMPACTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E OS MODELOS DE ALORREATIVIDADE <i>KIR</i> .....	68
4.7.1	<b>Subgrupo mieloide.....</b>	71
4.7.2	<b>Dubgrupo linfoide.....</b>	75
4.8	IMPACTO CLÍNICO DA VARIAÇÃO ALÉLICA .....	78
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico (aloTCTH) é uma terapia curativa aplicada para diversas doenças hematológicas, genéticas e imunológicas<sup>2</sup>. Essa terapêutica foi desenvolvida a partir de estudos dos efeitos corpóreos da irradiação no final dos anos 40, que objetivavam identificar formas de proteção e reparo do dano orgânico causado pela irradiação<sup>3</sup>. Os experimentos iniciais mostraram que era possível recuperar a hematopoese protegendo o baço dos animais ou com a infusão endovenosa de medula singênica<sup>4,5</sup>. No final da década de 50, surgiram os primeiros relatos de casos de infusão de medula óssea em pacientes com leucemia que obtiveram enxertia das células infundidas. Em menos de 5 anos (1959-1962), mais de 150 transplantes já haviam sido descritos. Após uma década, mais de 200 pacientes já haviam sido submetidos à infusão de medula óssea por doenças hematológicas e imunológicas, porém 60% apresentaram falha de enxertia e 25%, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), na época chamada de doença secundária<sup>6</sup>.

No final dos anos 60, os conhecimentos descritos por Jean Dausset a partir dos anos 50 sobre anticorpos induzidos por gestação e transfusão sanguínea que reagiam contra antígenos da superfície dos leucócitos, primeiramente caracterizados como HL-A (do Inglês *Hu-l Leucocyte - A*), iniciaram o conceito de seleção de doador<sup>7-9</sup>.

A partir de testes de culturas mistas de linfócitos, a análise do HL-A começou a ser usada para avaliação de irmãos de pacientes candidatos a transplante buscando doadores idênticos<sup>6,10</sup>. HL-A é, atualmente, conhecido como antígenos leucocitários humanos (HLA, do Inglês, *human leukocyte antigen*). O sucesso desses transplantes foi o impulso para o início da chamada era moderna do transplante de medula óssea, liderada por Edward Donnall Thomas, com um novo e crescente aumento do número de procedimentos, e com a melhoria dos resultados associada ao desenvolvimento das técnicas de histocompatibilidade.

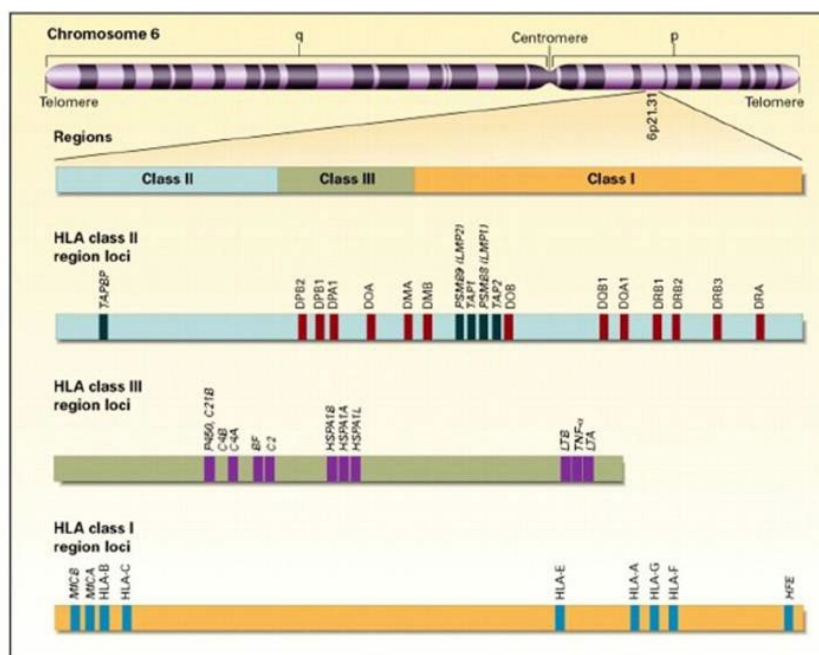
Ainda nos dias atuais, o número de aloTCTH segue em ascensão. Segundo relatórios do registro internacional CIBMTR (do Inglês, *Center for Internacional Blood and Marrow Transplant Research*, Centro internacional para pesquisas em transplante de sangue e medula), são reportados nos Estados Unidos mais de 8.000 transplantes dessa modalidade, anualmente<sup>11</sup>. Nas últimas décadas, novas opções de regimes de condicionamento, critérios de seleção de doadores, profilaxia de doença do enxerto contra o hospedeiro e terapias de suporte levaram ao

aumento do perfil de elegibilidade dos pacientes e melhora dos desfechos clínicos associados a essa terapia.

## 1.2 IMUNOGENÉTICA DO TCTH ALOGÊNICO

Os antígenos leucocitários humanos são um complexo grupo de proteínas encontradas na superfície celular com papel fundamental na capacidade do sistema imune de diferenciar o próprio do não próprio<sup>12</sup>. As moléculas HLA são codificadas por genes da região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do Inglês, *Major Histocompatibility Complex*), a mais densa região do genoma humano localizada no cromossomo 6<sup>13</sup>. O MHC é dividido em três subclasses: classe I (altamente polimórfico), classe II (menor variabilidade de genes envolvidos em processamento e apresentação de antígenos) e classe III (genes implicados na resposta inflamatória, maturação leucocitária e cascata de complemento)<sup>14</sup> (Figura 1).

**Figura 1 -** Localização e estrutura do Complexo Principal de Histocompatibilidade<sup>15</sup>



Fonte: Klein, 2000.

As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e apresentam antígenos para as células T CD8+ enquanto as moléculas de classe II são expressas nas células especializadas na apresentação de antígenos e apresentam os peptídeos para as células T helper CD4+<sup>15,16</sup>. Por meio da interação entre as moléculas HLA e as células T efectoras, há o efeito



citotóxico das células T do doador contra as células leucêmicas residuais do receptor, caracterizando o efeito GVL (do Inglês, *graft versus leukemia*). Tal interação também é responsável pelo risco de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Na DECH, as células imunes do doador infiltram tecidos do receptor induzindo uma atividade inflamatória sistêmica e seu risco está relacionado à disparidade entre as moléculas HLA de doador e receptor, assim como, diversos antígenos de histocompatibilidade menor<sup>12</sup>.

A compatibilidade HLA tem sido a maior barreira imunológica para a realização do aloTCTH, sendo as incompatibilidades entre doador e receptor relacionadas a maiores riscos de doença do enxerto contra o hospedeiro e rejeição do enxerto, seja com doadores aparentados seja com não aparentados<sup>17,18</sup>.

Considerando os significativos desenvolvimentos na tipificação HLA, os consensos internacionais recomendam que a seleção de doador para aloTCTH considere genes de classe I (A, B e C) e de classe II (no mínimo, DRB1). Outros genes de classe II, considerados como *loci* de baixa expressão (DQB1, DRB3/4/5 e DPB1) devem ser considerados principalmente quando existirem doadores não aparentados equivalentes ou para os pacientes que sejam sensibilizados com anticorpos anti-HLA. Num grande número de centros, a tipificação de DQB1 é feita de rotina e com a incorporação das técnicas de sequenciamento pelos laboratórios clínicos, os outros *loci* também vêm sendo tipificados. Estudos em doadores não aparentados mostraram impacto de incompatibilidades nesses *loci* em vários desfechos clínicos pós- aloTCTH<sup>19-21</sup>. Entretanto, nos doadores aparentados haploidênticos, o número de incompatibilidades não mostrou impacto clínico relevante, principalmente com a plataforma de imunossupressão com ciclofosfamida pós-transplante<sup>22,23</sup>. Embora o número de incompatibilidades não tenha impacto clínico, disparidade nas moléculas de classe II DRB1 e DPB1 (pelo modelo *TCE*, do Inglês, *T cell epitope*, epítipo de célula T) assim como no HLA B *leader* estão associadas aos desfechos clínicos de sobrevida livre de doença, sobrevida global e recaída nessa modalidade de transplante<sup>24</sup>.

Outras moléculas dentro e fora do MHC, como os genes *HLA-E*, *HLA-F*, *MICA* e *KIR*, têm sido estudadas para avaliar o impacto nos desfechos clínicos pós-alotCTH, com resultados menos robustos e ainda não rotineiramente aplicadas no processo de seleção de doador<sup>25-27</sup>. Dentre tais moléculas, os receptores de células NK tipo imunoglobulinas – KIR (do Inglês, *Killer immunoglobulin receptor*) – estão dentre os que despertam maior interesse da comunidade científica pela capacidade potencial de promover uma maior atividade enxerto *versus* tumor e aumentar as taxas de cura das neoplasias hematológicas com o aloTCTH.

### 1.3 REGIME DE CONDICIONAMENTO TLI-ATG

Estruturado com dois objetivos principais, o regime de condicionamento para TCTH visa permitir o controle do “burden” tumoral (terapia de ablação) e estabelecer ação imunossupressora para enxertia das células-tronco hematopoiéticas<sup>28</sup>. Dessa forma, os regimes de condicionamento são classificados de acordo com a capacidade de mieloablação e o potencial imunossupressor<sup>29,30</sup>.

O protocolo TLI-ATG (sigla, do Inglês, *Total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin*, irradiação corporal total e globulina antitimocítica) foi desenvolvido a partir de estudos pré-clínicos como um condicionamento não mieloablativo que objetivava redução das taxas de DECH aguda grau II-IV<sup>31</sup>. Doses repetidas de irradiação focadas no tecido linfoide, associadas ao anticorpo anti-células T são responsáveis pela alteração no padrão de liberação de citocinas do linfócito T do doador, aumentando a polarização para células T helper tipo 2 (Th2), com aumento da secreção de interleucina 4 (IL-4) e da presença de células T NK do receptor<sup>32</sup>.

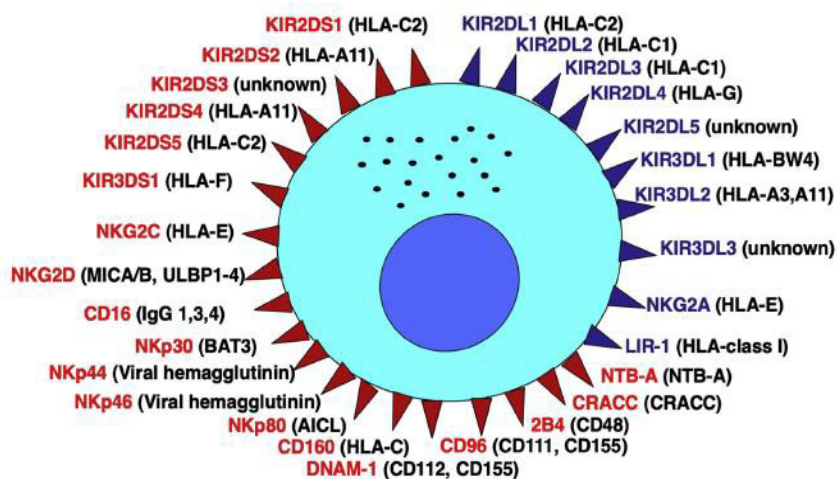
Lowsky e colaboradores demonstraram, numa coorte inicial de pacientes com neoplasias hematológicas de origem mieloide e linfoide, baixas taxas de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda, mantendo o efeito antitumor do enxerto. Diversos trabalhos descrevendo os resultados desse protocolo se seguiram à publicação inicial<sup>33-37</sup>. Em 2019, Spinner e colaboradores publicaram os resultados maduros da coorte com um total de 612 pacientes num seguimento mediano de 6 anos. A maioria dos pacientes tinha os diagnósticos de leucemia mieloide aguda (LMA, n=193) e linfoma não Hodgkin (LNH, n=175), sendo 85% dos doadores HLA-compatíveis e 44% aparentados. Um terço da coorte apresentava índice de comorbidades (HCT-CI) elevado ( $\geq 3$ ) e índice de risco da doença (DRI) de alto ou muito alto risco. Por se tratar de uma regime não mieloablativo, 98% dos pacientes foram transplantados em regime ambulatorial, com 57% dos pacientes não necessitando de internação nos primeiros 100 dias após o transplante. A incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro graus II-IV foi de 12% e de DECH crônica extensa foi de 22% e 27% no primeiro e segundo ano pós-transplante, respectivamente. A mortalidade não relacionada à recaída foi de 9% em 1 ano e 13% em dois anos. A sobrevida livre de progressão em 4 anos foi de 32%, 21%, 45% e 49% para os pacientes com LMA, Síndrome mielodisplásica (SMD), LNH e Linfoma de Hodgkin (LH), respectivamente<sup>37</sup>.

## 1.4 CÉLULAS NK

Células Natural Killer (NK) são linfócitos identificados por Kiessling e colaboradores em 1975 como células com atividade citotóxica contra células leucêmicas<sup>38</sup>. Correspondem de 5 a 20% das células mononucleares do sangue periférico, e também estão presentes em tecidos não linfoides, participando da resposta imune inata precoce, com capacidade de reconhecer e exercer citotoxicidade antes de sua sensibilização<sup>39,40</sup>. Trata-se de uma família diversa de células especializadas com a função de proteção contra infecções virais, manutenção da barreira imune placentária e vigilância da transformação maligna das células<sup>41</sup>.

Diferente dos linfócitos que possuem a capacidade de realizar mutações somáticas, as células NK utilizam a diversidade de expressão de receptores como forma de constituir um conjunto celular com diferentes características funcionais. Essas células expressam uma grande variedade de receptores ativadores e inibidores que integrados determinam sua função efetora<sup>42,43</sup> (Figura 2).

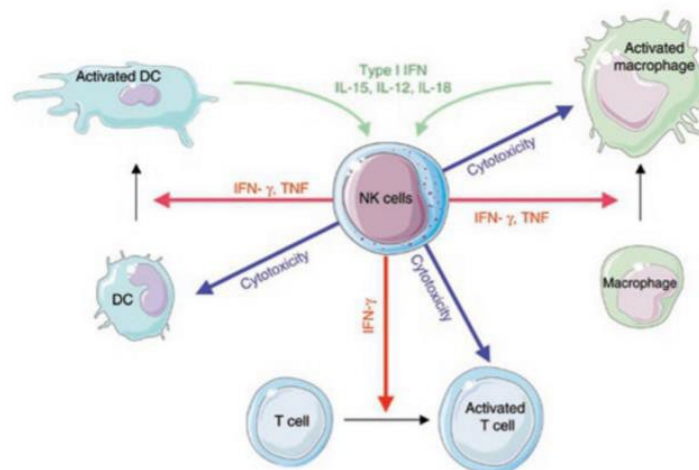
**Figura 2 -** Receptores das células NK inibidores e ativadores, e seus respectivos ligantes



Fonte: Modificado de Tanaka (2020)<sup>44</sup>.

A interação desses receptores com suas moléculas-alvo (ligantes) dispara uma cascata de sinais que ativam as células NK induzindo uma ação citolítica direta, com a liberação de granzima B e perforina, e indireta via citotoxicidade celular mediada por anticorpo<sup>45</sup>. Essa resposta celular depende de um microambiente de citocinas e interações com as outras células do sistema imune, como células T, células dendríticas e macrófagos<sup>40,46</sup> (Figura 3).

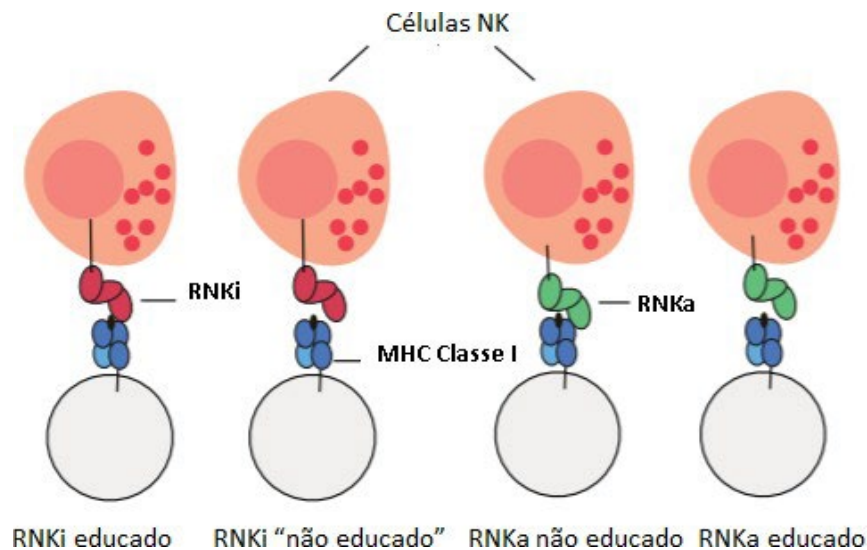
**Figura 3** - Microambiente de interação das células NK. Por meio de citocinas inflamatórias, as células NK interagem favorecendo o amadurecimento de células dendríticas, macrófagos e células T<sup>40</sup>.



Fonte: Vivier, 2008.

As células NK durante sua maturação reconhecem moléculas “próprias” (ou, do Inglês, “*self*”) que são expressas em condições basais. O processo de educação das células NK por meio dos receptores inibitórios é chamado de “*licensing*”<sup>47,48</sup>. Quando os receptores inibidores das células NK reconhecem os seus ligantes específicos, elas são suprimidas. A ausência de ligantes inibidores e o reconhecimento de proteínas de “stress” pelos receptores ativadores provém o gatilho da resposta imune. Esse processo de educação das células NK ocorre por meio dos seus receptores inibidores CD94/NKG2 e receptores KIR, cujos ligantes são moléculas do HLA de classe I. CD94/NKG2 é um receptor de lecitinas do tipo C que se liga ao HLA-E, molécula do complexo MHC classe I não clássico. Os receptores KIR são glicoproteínas de alta especificidade que se ligam a epítomos das moléculas de HLA classe I (C1, C2, Bw4, A3/A11). Como um mecanismo de tolerância imune, células NK “não educadas” são hiporresponsivas a células do próprio indivíduo que não possuem os ligantes (Figura 4).

**Figura 4** - Esquema do processo de educação das células NK. RNKi - Receptores NK inibidores (vermelho) reconhecem um ligante classe I para se tornar educado. RNKa – Receptores NK ativadores (verde) são educados quando não reconhecem nenhuma molécula MHC própria.



Fonte: Modificado de Carrillo-Bustamante, 2014<sup>49</sup>.

Desse modo, a imunidade das células NK se baseia em detectar “*stress*” celular nas células-alvo, por meio da perda ou redução de expressão de HLA de classe I e aumento da expressão de moléculas ligantes dos receptores ativadores levando à citotoxicidade<sup>50</sup>.

Assim como diversas espécies virais, as células cancerígenas promovem uma redução (*down regulation*) ou perda da expressão das moléculas HLA de classe I como mecanismo de evasão imune<sup>51-53</sup>. Entretanto, as células neoplásicas podem aumentar (*up regulation*) essa expressão em situações inflamatórias, mostrando uma janela estreita para a resposta citotóxica eficiente dessas células<sup>41</sup>.

Dentro do contexto do aloTCTH, se atribui a elas importante contribuição no efeito GVL<sup>54</sup>. O componente do efeito enxerto *versus* leucemia atribuído às células NK é um fenômeno com maior evidência para a leucemia mieloide aguda<sup>55,56</sup>. Além do efeito GVL, as células NK são o primeiro subtipo de linfócito citotóxico a se reconstituir pós-alotCTH e, embora tenham, nesse momento, atividade prejudicada quando comparada com células de doadores saudáveis<sup>57</sup>, acredita-se que seja possível que elas tenham uma contribuição em outros desfechos, como doença do enxerto contra o hospedeiro, infecção e enxertia<sup>45</sup>.

De maneira estocástica, as células NK silenciam ou expressam os genes *KIR* modificando o fenótipo, especificidade e capacidade funcional de sua ação citotóxica<sup>41</sup>. Assim, a atividade das células NK só pode ser predita a partir da avaliação genética, o que tem

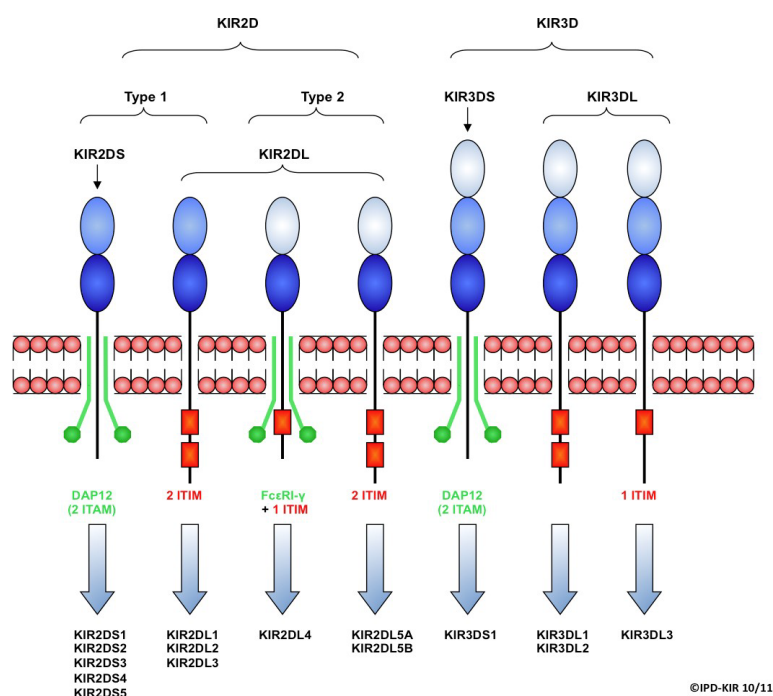
conduzido a uma série de estudos para determinar o impacto da genética das células NK dos desfechos do aloTCTH<sup>58</sup>.

## 1.5 OS RECEPTORES KIR

Os receptores KIR são o grupo mais estudado de receptores de células NK. São proteínas transmembranas que reconhecem moléculas HLA de classe I. As proteínas KIR podem ter 2 ou 3 domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (KIR2D ou KIR3D). Também possuem um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática, que pode ser curta (S – do Inglês, *short*) ou longa (L – do Inglês, *long*). As caudas longas contêm dois ITIM (do Inglês, *immune tyrosine-based inhibitory motifs*) com exceção de KIR2DL4, que possui apenas 1. Os de cauda curta apresentam um aminoácido (Figura 5).

A interação dos receptores inibidores KIR e seus ligantes cognatos é importante para evitar a agressão das células NK em direção às células autólogas assim como para “educar” sua função efetora, uma vez que as células que expressam receptores KIR para seus HLA de classe I são mais responsivas à estimulação NK<sup>59</sup>. Em condições altamente inflamatórias, células NK não “educadas” podem superar essa diferença contribuindo para a resposta imune<sup>60,61</sup>.

**Figura 5** - Estrutura das proteínas KIR



Fonte: IPD/KIR, disponível em <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>.

Os receptores KIR2DL2 e KIR2DL3 reconhecem o grupo 1 do HLA C (alelos que contêm serina no resíduo 77 e asparagina no resíduo 80 da alfa hélice). As moléculas KIR2DL1 e KIR2DS1 têm como ligantes o grupo 2 do HLA C (asparagina no resíduo 77 e lisina no resíduo 80). KIR3DL1 se liga ao epítipo Bw4, enquanto KIR3DL2 e KIR2DS2 se ligam ao HLA A3 e A11, e KIR2DL4 se liga ao HLA G<sup>62,63</sup>. Embora os genes dos sistemas HLA e KIR estejam em diferentes cromossomos, 6p21.1 e 19q13.4, respectivamente, e a divisão celular meiótica leve a processos evolucionários distintos, há evidência de que possa ter havido uma coevolução induzindo a interações máximas entre os dois sistemas<sup>64,65</sup>.

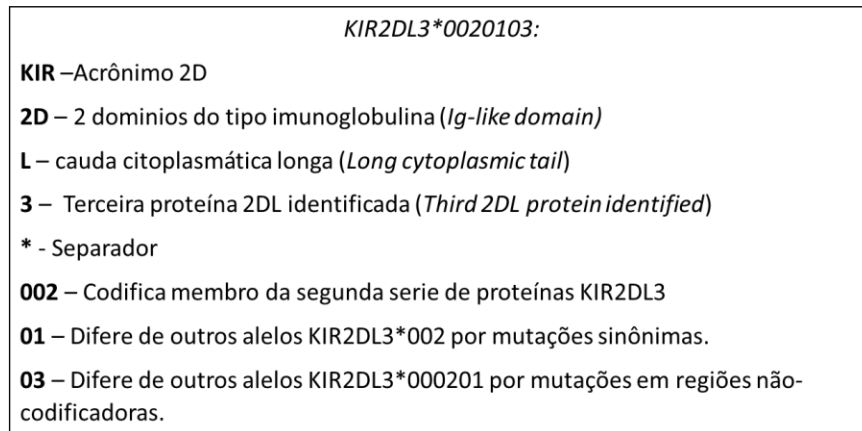
Embora a relação entre os receptores inibidores e as moléculas HLA classe I seja bem caracterizada, os ligantes dos receptores ativadores são parcialmente conhecidos<sup>66</sup>. Além de KIR2DS1 e KIR2DS2 já mencionados anteriormente, KIR3DS1 exibe afinidade para HLA-B Bw4 e HLA-F<sup>67,68</sup>. KIR2DS1 é o único receptor ativador que se conhece como participante do processo de educação das células NK<sup>69</sup>. Células KIR2DS1 positivas são hiporresponsivas num ambiente rico em HLA C2.

## 1.6 OS GENES *KIR*

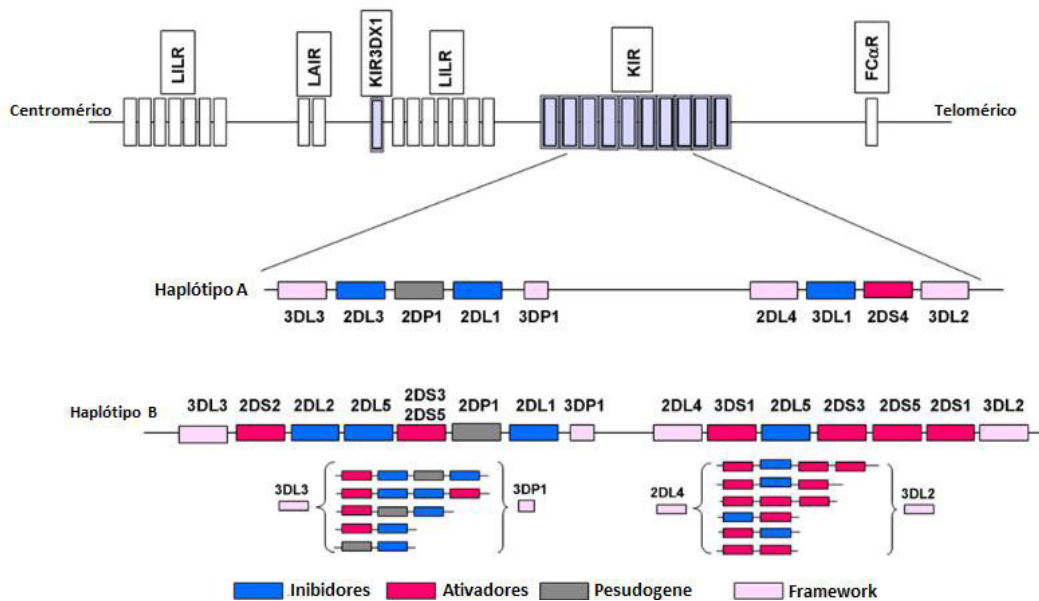
Embora a primeira tipificação tenha ocorrida há mais de 20 anos<sup>48</sup>, a região genômica *KIR* só foi descrita em alta resolução recentemente<sup>70-72</sup>.

Os genes *KIR* estão localizados no braço longo do cromossomo 19 na região q13.4. Essa região é composta por até 14 genes que codificam receptores inibidores, ativadores e imunomodulatórios, além de 2 pseudogenes, *KIR2DPI* e *KIR3DPI*<sup>66</sup>. A nomenclatura dos genes *KIR* está descrita na Figura 6.

Um pseudogene adicional, *KIR3DX1*, inicialmente nomeado *KIR3DL0*, é localizado separadamente (Figura 7). O conteúdo gênico é variável dentro da população, com alta diversidade tanto na presença como no número de cópias de cada gene<sup>73</sup>.

**Figura 6 –** Nomenclatura dos genes *KIR*

Fonte: Modificado de Wright, 2020 e IMGT database, disponível em <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/nomenclature.html><sup>66,74</sup>.

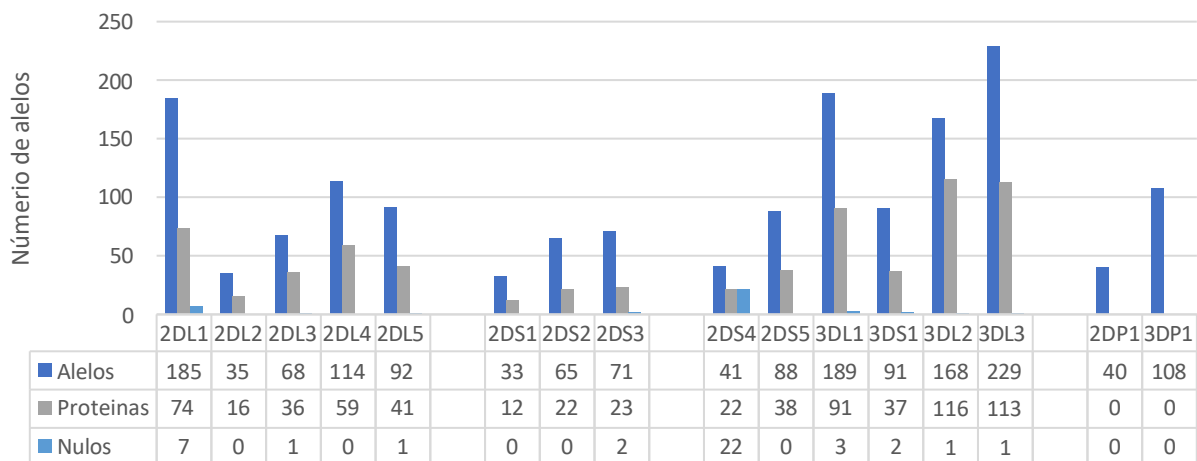
**Figura 7 -** Organização genômica do cluster *KIR* localizado no cromossomo 19q13.4 dentro do complexo de receptores leucocitários. Caracterização do haplótipo A, com conteúdo gênico fixo e dos haplótipos B, com variados número de genes.

Fonte: Modificado de Kulkarni, 2008<sup>73</sup>.

O cluster *KIR* é considerado como uma das regiões mais diversas em tamanho e conteúdo do genoma humano. Recombinações homólogas não alélicas permitem a inserção e/ou deleção de genes *KIR* completos de um para outro haplótipo<sup>66</sup>. Também há extenso polimorfismo alélico com mais de 1400 alelos descritos segundo a base de dados IPD-KIR (Gráfico 1), sendo mais pronunciado nos genes inibidores.



**Gráfico 1** - Número de alelos, proteínas e genes nulos descritos de cada gene *KIR*, de acordo com IMGT



Fonte: IMGT (*Release 2.12*), dezembro, 2022<sup>75</sup>.

A estrutura dos genes é relativamente conservada, com 8 (genes com 2 domínios) ou 9 éxons (genes com 3 domínios), com exceção de *KIR3DL3* que possui 8 éxons<sup>66</sup>. Os éxons 1 e 2 constituem a sequência líder, os éxons de 3 a 5 determinam os domínios extracelulares D0, D1 e D2 respectivamente. O éxon 6 forma o “*stem*” que conecta o domínio D2 com a porção transmembrana, codificada pelo éxon 7. A extremidade citoplasmática é codificada pelos éxons 8 e 9. No gene *KIR3DL3*, a região do ‘*stem*’ foi incorporada à região transmembrana codificada pelo éxon 7. Os pseudogenes possuem estruturas distintas. *KIR2DP1* possui 8 éxons e um pseudoéxon 3. *KIR3DP1* é o gene mais curto, com 5 éxons<sup>76-78</sup>.

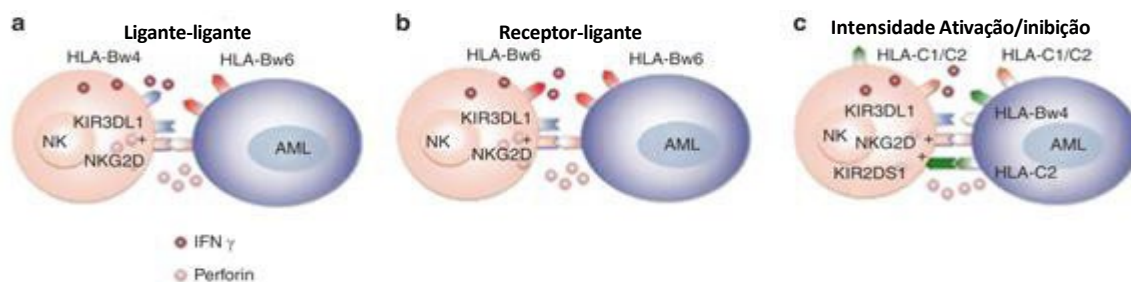
Dois tipos de haplótipos foram descritos com base no conteúdo gênico, chamados A e B. O haplótipo A apresenta um número fixo de genes (*KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1* e *KIR3DL2*) com apenas 1 gene de receptor ativador (*KIR2DS4*). O haplótipo B é caracterizado por uma variabilidade no número de genes apresentando até 5 genes de receptores ativadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*). Quatro genes moldura definem a região codificadora como centromérica (*KIR3DL3* no terminal 5’ e *KIR3DP1* no 3’) ou telomérica (*KIRDL4* no terminal 5’ e *KIR3DL2* no 3’)<sup>45</sup>.

Por causa do rearranjo gênico e da similaridade alta das sequências, há facilidade de ganho e perda gênica, de modo que cada *loci KIR* pode apresentar variação no número de cópias, principalmente nos haplótipos B<sup>79</sup>.

## 1.7 MODELOS DE ALORREATIVIDADE KIR

Como são localizados em diferentes cromossomos, os genes HLA de classe I e os genes *KIR* segregam de forma independente, gerando pares de doadores e receptores com incompatibilidades de ligantes, mesmo entre pares HLA-compatíveis. Diversos estudos foram conduzidos utilizando diferentes modelos de compatibilidade KIR-HLA do par doador-receptor para avaliar o impacto das células NK no controle de doença e outros desfechos pós-transplante<sup>56,80-84</sup>. Esses modelos se baseiam no método de tipificação HLA do doador e na disponibilidade da tipificação KIR (Figura 8). Entretanto, a maioria dos modelos que usou a tipificação KIR do doador só considera a presença ou ausência dos genes, não avaliando os efeitos das variações qualitativas e quantitativas que os diferentes alelos podem apresentar (Tabela 1).

**Figura 8 -** Modelos de alorreatividade NK induzindo GVL pós-transplante



Fonte: Modificado de Fleischhauer e cols.<sup>63</sup>.

A primeira evidência clínica do efeito KIR foi mostrada no contexto de aloTCTH haploidêntico com seleção de células CD34+. Ruggeri e colaboradores mostraram que a ausência do ligante KIR do doador no receptor se correlacionava com menor risco de recaída de neoplasias hematológicas, descrevendo o modelo, em Inglês, “*missing self*” ou ligante-ligante<sup>82,85,86</sup>.

No contexto de transplantes HLA-compatíveis, em que não há incompatibilidade de ligantes, foi descrito o modelo, em Inglês, “*missing ligand*” ou receptor ligante. Indivíduos podem não ter os ligantes para seu próprio repertório KIR, por exemplo, um paciente homocigoto para Bw6 pode apresentar KIR3DL1. Dessa forma, algumas células NK são consideradas “não educadas” e, também, não inibidas quando em contato com as células malignas. Para avaliar o efeito de células NK “não educadas” como potencial indutor de GVL,

diversos estudos foram conduzidos, mostrando uma menor incidência de recaída e melhora da sobrevida livre de progressão<sup>60,87-89</sup>.

Considerando que o genótipo do receptor não pode ser alterado, uma outra forma de avaliar a alorreatividade potencial e, conseqüentemente, o efeito GVL é por meio dos haplótipos *KIR* do doador. Estudos retrospectivos de registros foram conduzidos para testar essa hipótese, os quais mostraram que a presença do haplótipo B centromérico (cenB) está associada à menor chance de recaída pós-transplante principalmente com doadores homocigotos para cenB (cenBB)<sup>80,90,91</sup>. Um estudo recente do CIBMTR mostrou o impacto positivo de doadores com haplótipo B na recaída de LMA em pacientes que receberam regimes de condicionamento de intensidade reduzida<sup>90</sup>.

A interação entre *KIR2DS1* e seu ligante específico HLA-C2 foi estudada no contexto de aloTCTH não relacionado 10/10 ou 9/10 para pacientes com LMA. Nesse modelo, a presença de *KIR2DS1* esteve associada à menor incidência de recaída em pacientes com HLA- C C1/x. Doadores homocigotos C2/C2 tiveram maior incidência de recaída, suprimindo, inclusive, o efeito protetor dos haplótipos B<sup>56,91,92</sup>.

*KIR3DL1* também foi estudado como modelo de alorreatividade por sua ligação com o epítipo Bw4 das moléculas de HLA B. Esse par apresenta importante polimorfismo e impacto na educação das células NK<sup>47,93</sup>. Nesse primeiro modelo que avalia a variabilidade alélica dos genes *KIR*, os alelos *KIR3DL1* foram divididos de acordo com seu nível de expressão celular, possuindo subtipos de ligantes específicos. *KIR3DL1-h* são altamente expressos na superfície das células NK e se ligam com maior afinidade às moléculas com Ile<sup>80</sup> (Bw4-80I), enquanto *KIR3DL1-I* são fracamente expressos e *KIR3DL1-null* é retido no espaço intracitoplasmático. Estudo de Bordeau et al. mostrou impacto em recaída e sobrevida global com melhores resultados nos pares com baixa afinidade<sup>84</sup>. Mais recentemente, o modelo foi estudado por um grupo independente, não validando os resultados iniciais. Com uma coorte de pacientes mais recente, e com características clínicas divergentes quanto à idade, intensidade do regime de condicionamento, profilaxia de DECH e fonte de células, a ausência de benefício clínico de uma menor afinidade entre *KIR3DL1* do doador e o epítipo Bw4 do receptor mostram que outras variáveis podem interferir nesse efeito, e que validações desses modelos são importantes antes de generalizações para a prática clínica de seleção de doador<sup>94</sup>.

Nos últimos anos, modelos que integram as interações entre os receptores ativadores e inibidores *KIR* e seus respectivos ligantes têm sido propostos. Bolen e colaboradores propuseram um *score* inibitório que avalia a interação funcional entre os receptores inibitórios *KIR* e seus ligantes, demonstrando efeito na progressão de doenças infecciosas virais (HIV,

VHC e HTLV). Nesse contexto, *score* inibitório elevado se correlacionou com efeitos protetores<sup>95</sup>. Esse modelo foi testado por Schetelig e colaboradores numa coorte de transplantes alogênicos com doadores não aparentados para pacientes com SMD e LMA secundária a partir de dados do registro CIBMTR e EBMT, e encontrou associação com o risco de recaída e sobrevida livre de evento<sup>96</sup>. Genótipos de doadores com múltiplos genes KIR inibitórios funcionalmente relevantes foram associados com menor risco de recaída.

Outro modelo semelhante, analisando as interações dos genes KIR e seus respectivos ligantes, foi proposta por Krieger e colaboradores, utilizando um modelo matemático com um sistema de matrix e equação de operação de vetores, que pondera os efeitos de todas as interações individuais KIR-HLA. Na publicação inicial, o conteúdo KIR inibitório do doador esteve associado ao risco de recaída tanto na presença quanto na ausência dos ligantes<sup>97</sup>. Esse modelo foi aplicado em uma grande coorte do registro CIBMTR de pacientes com LMA, mostrando que o conteúdo KIR inibitório máximo (combinação dos componentes inibitório e *missing*) esteve associado ao menor risco de recaída, mesmo no subgrupo de pacientes que receberam globulina antitimocítica<sup>98</sup>. Nessa coorte, todos os doadores com *score* máximo possuíam haplótipo B/x, mostrando a interação existente entre os modelos descritos.

## 1.8 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o NGS (do Inglês, *Next generation sequencing* – sequenciamento de próxima geração) para a tipificação HLA foi introduzido nos laboratórios clínicos, promovendo maior resolução e extensão com o sequenciamento em fase<sup>99</sup>. Essa técnica para a tipificação *KIR* foi desenvolvida recentemente e pode permitir a resolução alélica com menor ambiguidade e a variação do número de cópias por gene, permitindo a definição do “*status*” homocigoto/heterocigoto<sup>100</sup>. Os estudos ainda mostram resultados contraditórios quanto ao impacto nos desfechos clínicos pós-transplante, não considerando diferenças alélicas e de número de cópias dos genes de modo que nós postulamos que, com essa análise, podemos entender melhor a influência dos genes *KIR* no cenário do aloTCTH<sup>45</sup>, especificamente nos transplantes não mieloablativos com o protocolo TLI-ATG.

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Correlacionar os haplótipos *KIR* definidos por nível alélico de resolução por NGS com incidência acumulada de recaída em 2 anos pós-TCTH alogênico de doadores HLA compatíveis aparentados e não aparentados (10/10).

### 2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Descrever a frequência dos alelos de cada gene *KIR* em alta resolução;
- Descrever o número de cópias dos genes *KIR*;
- Correlacionar o número de cópias de determinados genes: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4*, *KIR3DL2* e *KIR2DL2* com o desfecho primário de recaída;
- Avaliar o impacto dos modelos Haplótipo *KIR*, receptor-ligante, *KIR3DL1-Bw4* e *KIR2DS1*-grupo C nos desfechos clínicos;
- Avaliar o impacto conjunto das interações dos receptores *KIR* com os ligantes conhecidos de HLA classe I nos desfechos clínicos;
- Correlacionar os haplótipos *KIR* com os desfechos clínicos pós-transplante: sobrevida global, mortalidade não relacionada à recaída e doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica;
- Analisar a presença dos alelos *KIR* mais frequentes com os desfechos clínicos pós-transplante: sobrevida global e recaída.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DO HOSPITAL E DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

O Stanford Hospital é parte do complexo hospitalar *Stanford Health Care* fundado em 1959 como o hospital universitário da Faculdade de Medicina da Stanford University, no qual são realizadas atividades de ensino, pesquisa e assistência. Trata-se de um hospital privado de alta complexidade dentro do sistema de saúde dos Estados Unidos da América. O programa de transplante de células-tronco hematopoiéticas tem 30 anos e é acreditado pela FACT (do Inglês, *Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy*) e pelo NMDP (do Inglês, *National Marrow Donor Program*). São 22 leitos na unidade de internação, realizando, aproximadamente, 400 transplantes por ano, sendo 58% autólogos e 42% alogênicos.

#### 3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo de coorte retrospectiva de pacientes adultos submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico de janeiro de 2007 a janeiro de 2017.

#### 3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes adultos submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico com doadores HLA-compatíveis aparentados ou não aparentados para neoplasias hematológicas, usando o protocolo do regime de condicionamento TLI-ATG, com fonte sangue periférico e profilaxia de doença do enxerto contra o hospedeiro com as drogas ciclosporina e micofenolato mofetila.

Foram excluídos pacientes cujas amostras remanescentes do doador fossem inadequadas ou ausentes para a tipificação KIR.

#### 3.4 PROTOCOLO DE TRANSPLANTE

O protocolo de aloTCTH consistiu na infusão do regime de condicionamento TLI-ATG conforme descrito previamente<sup>31,34,101</sup>. A timoglobulina de coelho (Sanofi Genzyme, Boston, MA) foi administrada na dose de 1,5mg/kg por 5 dias consecutivos, iniciando no D-11 antes do transplante. Irradiação linfóide total foi administrada diariamente em frações de 800cGy por 8



doses entre os dias D-11 e D-7 e D-4 e D-2, com duas doses adicionais do D-1. A partir de maio de 2009, a dose total de TLI foi aumentada para 12Gy, com frações de 1200cGy nas mesmas datas previstas pelo protocolo inicial. O aumento da dose teve como objetivo melhorar a enxertia e o quimerismo. Todos os pacientes receberam células-tronco de sangue periférico mobilizadas por fator de crescimento de granulócitos no D0 e a profilaxia para DECH foi realizada com ciclosporina e micofenolato mofetila. Na ausência de DECH, o desmame de ciclosporina era realizado entre os dias D100 a D180 e micofenolato mofetila era descontinuado no D28 nos transplantes de doadores relacionados e desmamado entre os dias 42 a 96 nos transplantes de doadores não relacionados. Todos os pacientes receberam profilaxia antimicrobiana de acordo com os protocolos institucionais com aciclovir, fluconazol e quinolona<sup>37</sup>.

### 3.5 DADOS CLÍNICOS

Foram obtidos da base de dados de transplante do programa do Stanford Hospital os seguintes dados clínicos.

#### 3.5.1 Relacionados ao paciente

- Gênero;
- Idade no transplante;
- Raça e etnia;
- “Status” sorológico para citomegalovírus;
- “Performance status” – escala Karnofsky;
- Índice de comorbidade HCT-CI.

#### 3.5.2 Relacionados à doença de base

- Diagnóstico: leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásica, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin e leucemia linfocítica crônica;
- Grupo de doença: mieloide e linfoide;
- “Status” da doença pré-transplante: remissão completa, remissão parcial, doença estável, progressão de doença, sem tratamento;

- Índice de risco de doença (DRI, do Inglês, *disease risk index*): baixo, intermediário, alto e muito alto<sup>102</sup>.

### 3.5.3 Relacionados ao doador

- Tipo de doador: aparentado ou não aparentado HLA-compatível 10x10;
- Idade;
- Gênero;
- “Status” sorológico para citomegalovírus.

### 3.5.4 Relacionados à imunogenética doador/receptor

- Presença dos epítomos Bw4 e Bw6;
- HLA C – Grupo C1 e C2;
- HLA A – A3/A11;

### 3.5.5 Relacionados ao transplante

- data do transplante;
- “status” atual: vivo ou morto;
- data do último seguimento;

## 3.6 DESFECHOS E DEFINIÇÕES

### 3.6.1 Desfecho primário

Recaída: definida como qualquer evidência de doença após o transplante (leucemias por citometria de fluxo e linfomas por imagem) e inclui progressão de doença para os pacientes com doença mensurável no momento do transplante.

### 3.6.2 Desfechos secundários

- Sobrevida Global: tempo entre o transplante e o último contato de seguimento ou óbito;
- Sobrevida livre de progressão: tempo entre o transplante e recaída, progressão ou óbito;
- Mortalidade não relacionada à recaída: todas as causas de morte exceto por progressão de doença ou recaída;
- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda: definida de grau I a IV;
- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica: classificada em limitada ou extensa<sup>103</sup>.

### 3.7 GENOTIPAGEM *KIR*

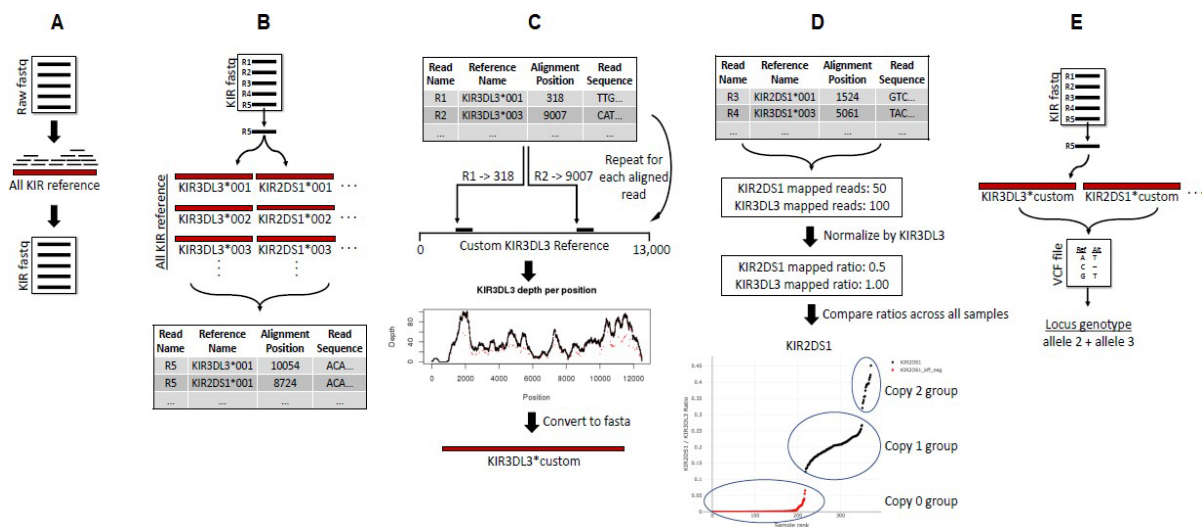
A genotipagem *KIR* foi realizada usando amostras de dsDNA (15-20 na concentração de 100-110ng/μL) já disponíveis no *Stanford Histocompatibility, Immunogenetics and Disease Profiling Laboratory*, laboratório em que essas amostras foram processadas. O protocolo de sequenciamento NGS foi realizado conforme publicado por Norman e colaboradores<sup>100</sup>, usando a pipeline de bioinformática PING (*Pushing Immunogenetics to the Next Generation*) na conversão da sequência de dados obtidos de genes *KIR* altamente polimórficos em genótipos de alta resolução.

Inicialmente, foi realizada a classificação das leituras (do termo, em Inglês, *reads*) para isolar os segmentos que representam a região genômica *KIR* das que não, processo denominado filtragem (Figura 9). PING, então, obtém os genótipos *KIR* finais dessas leituras (*reads*) filtradas usando dois módulos principais que descrevem o gene e o conteúdo alélico para cada indivíduo, retornando, também, informações sobre novos SNPs (do Inglês, *single nucleotide polymorphisms*) identificados e alelos recombinantes.

O primeiro módulo (PING\_gc), que determina o número de cópias de cada gene *KIR*, foi usado para informar o segundo módulo (PING\_allele), o qual gera o dado alélico. Cada módulo é dividido em dois submódulos. *KIR Filter Fish* (KFF), usado nos dois módulos principais, analisa a sequência *KIR* com cadeia de sequências específicas e determina quais genes (KFFgc) ou alelos (KFFallele) estão presentes. A função realizada por KFF é equivalente à genotipagem com *sequence-specific oligonucleotide probes* (SSOPs). Para complementar

KFF, MIRA<sub>gc</sub> (baseado no programa MIRA)<sup>104</sup> e *Son of SAM tools* (SOS; AMtools)<sup>105</sup> criam alinhamentos de referências com o objetivo de determinar o conteúdo gênico e alélico, respectivamente. O resultado liberado está em conformidade com o formato da lista de genótipos (GL string) que é usado para reportar os dados de HLA e KIR pelos laboratórios clínicos<sup>106</sup>.

**Figura 9** - Passos para a determinação do conteúdo gênico e alélico pela pipeline PING2. A: filtragem *KIR reads*; B: alinhamento com alelos *KIR* conhecidos; C: construção das sequências referências; D: determinação do conteúdo gênico; E: determinação do genótipo *KIR* baseado nos SNPs variantes.



Fonte: Modificado de Marin et al. (2018).

### 3.8 GENOTIPAGEM HLA

As tipificações HLA do paciente e doador para classe I e classe II foram coletadas da base de dados do laboratório. Pacientes submetidos a TCTH aparentado HLA-compatível foram tipificados com resolução intermediária ou alta de classe I (HLA A, B e C) e alta resolução para classe II (HLA DRB1 e DQB1) pela técnica SSO. Pares doador/receptor de transplantes não relacionados foram tipificados em alta resolução para classe I e classe II (técnica de Sequenciamento por Sanger e NGS).

A partir da tipificação HLA, foram definidos os epítomos Bw4-80I/Bw4-80T/Bw6 de HLA-B<sup>107,108</sup>, os grupos C1 e C2 de HLA-C<sup>109</sup> e A3/A11 de HLA-A.

### 3.9 MODELOS DE ALORREATIVIDADE KIR

Os modelos de alorreatividade KIR analisados nesse estudo foram:

#### 3.9.1 Receptor-ligante: a presença do receptor KIR no doador de acordo com a presença do respectivo ligante HLA no paciente

- a. KIR2DL1 – HLA C2;
- b. KIR3DL2 – HLA A3/A11;
- c. KIR2DL2/3 – HLA C1;
- d. KIR3DL1 – Bw4.

A interação KIR3DL1 – Bw4 foi avaliada considerando a diferença alélica de KIR3DL1, conforme descrita por Boudreau e colaboradores<sup>84</sup>. Os alelos KIR3DL1 foram classificados de acordo com polimorfismo e expressão em KIR3DL1-H (do Inglês, *high*, alto), KIR3DL1-L (do Inglês, *low*, baixo) ou KIR3DL1-N (do Inglês, *null*, nulo) (Tabela 1), e o par de acordo com o potencial de inibição em par inibitório forte, fraco ou não inibitório (Tabela 2).

**Tabela 1 -** Classificação dos alelos KIR3DL1

Subtipo	Alelos de alta frequência	Alelos de baixa frequência
KIR3DL1-N	*004	*019, *021, *036, *037, *039, *040, *056, *063, *072
KIR3DL1-L	*005/*007	*041, *044, *053, *032, *033, *068
KIR3DL1-H	*001/*002/*015/*008	*016, *026, *027, *043, *052, *059, *060, *061, *064, *065, *067, *075, *006, *009, *017, *018, *020, *022, *023, *024N, *025, *028, *029, *030, *031, *034, *035, *038, *042, *051, *054, *057, *062, *066, *074, *076, *077

**Tabela 2 -** Classificação dos pares KIR3DL1/Bw

Par	Alelo KIR3DL1 - doador	Epítipo Bw receptor
Inibitório forte	KIR3DL1-L	Bw4-80T
	KIR3DL1-H	Bw4-80I
Não inibitório	Qualquer KIR3DL1	Bw6
	KIR3DL1-N	Bw4-80I/Bw4-80T
Inibitório fraco	KIR3DL1-H	Bw4-80T
	KIR3DL1-L	Bw4-80I

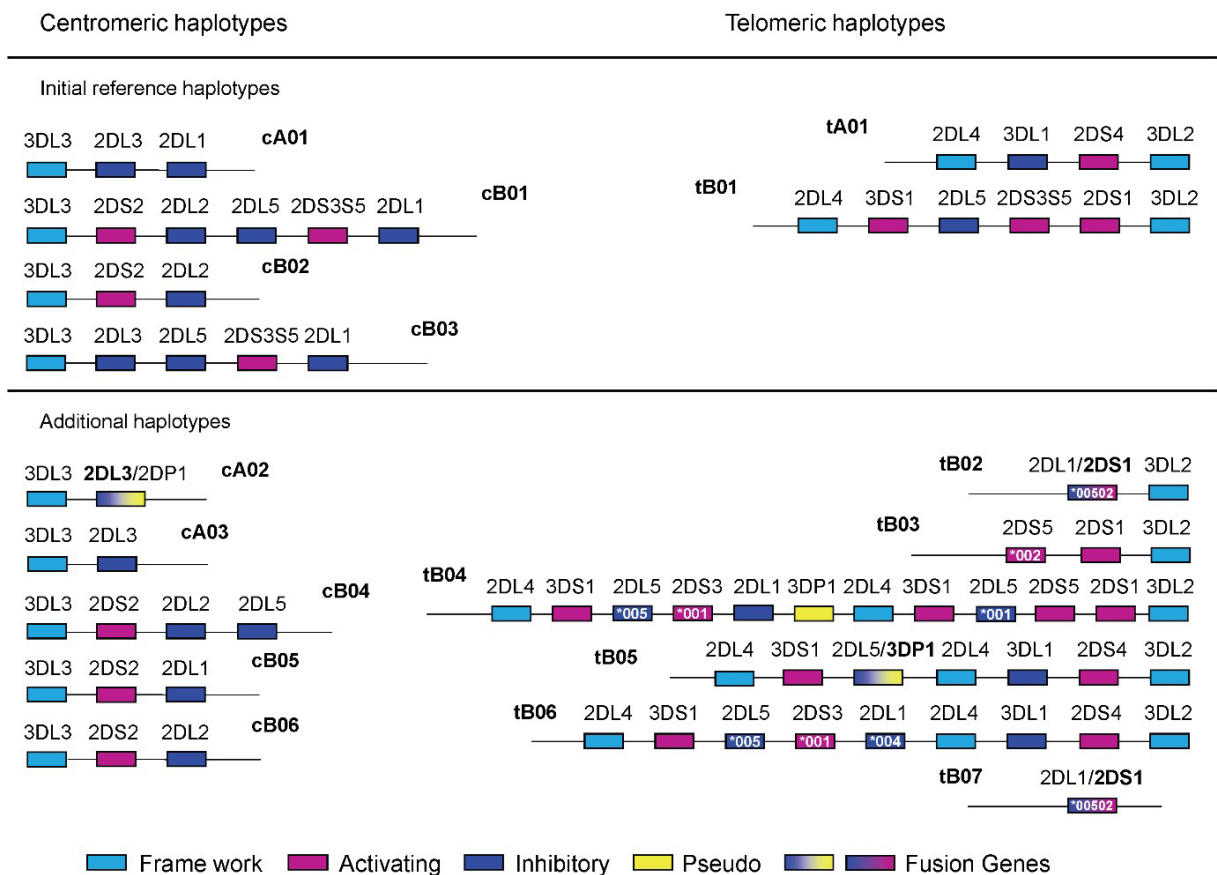
### 3.9.2 KIR2DS1 - HLA-C

A interação entre KIR2DS1 e o ligante HLA-C foi analisada de acordo com o modelo original<sup>56</sup>, considerando a presença e ausência do gene isolada, e em combinação com o genótipo HLA-C (C2/C2 vs. C1/x).

### 3.9.3 Haplótipos KIR do doador

Os haplótipos KIR do doador foram classificados em suas porções telomérica e centromérica de acordo com Vierra-Green e colaboradores conforme Figura 10<sup>70</sup>.

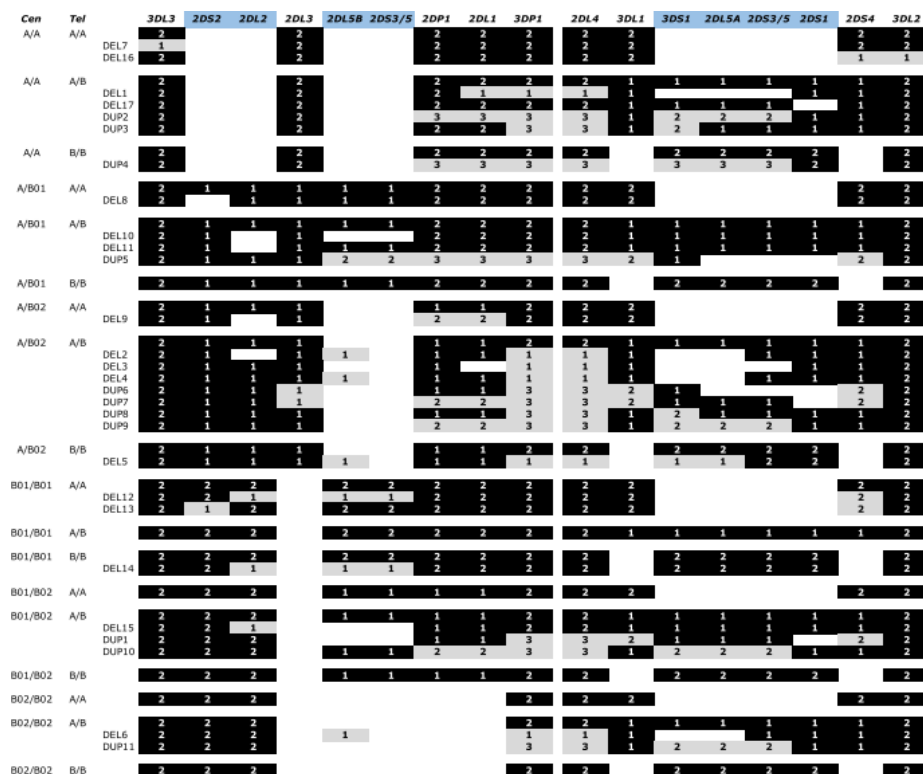
**Figura 10** - Referência das estruturas dos haplótipos KIR. As cores representam as características dos genes KIR: moldura (azul-claro), ativadores (magenta), inibidores (azul escuro), pseudogene (amarelo) e genes de fusão (gradiente).



Fonte: Vierra-Green, 2012.

Os haplótipos não classificados por essa referência foram classificados de acordo com genótipos descritos por Guethlein e colaboradores<sup>110</sup>. Tais haplótipos foram analisados e diferiam das haplótipos comuns por duplicações ou deleções, e, de acordo com o conteúdo gênico, foi atribuído ao genótipo frequente mais próximo (Figura 11). Uma análise de sensibilidade foi realizada para avaliar o impacto desses haplótipos na análise desse modelo.

**Figura 11** - Genótipos diferentes da estrutura comum por deleções (DEL) ou duplicações (DUP) gênicas. A presença do gene é indicada pelos retângulos preenchidos, e o número indica o número de cópias de gene presentes. O retângulo preto informa que o número de cópias está de acordo com o previsto, enquanto o retângulo cinza indica genes com número de cópias diferente do esperado.



Fonte: Ghethlein, 2021.

### 3.9.4 Modelos combinados

- a. IM-KIR score: o score foi calculado conforme publicado por Krieger e colaboradores<sup>98</sup> a partir da avaliação do componente KIR inibitório e KIR missing. O Quadro 1 apresenta o cálculo do score.

**Quadro 1** - Cálculo do IM-KIR *score*

<b>Interação inibitória KIR-KIRL</b>
Se 2DL1=presente e C2=presente, então i2DL1=1, caso contrário i2DL1=0
Se 2DL2=presente e C1=presente, então i2DL2=1, caso contrário i2DL2=0
Se 2DL3=presente e C1=presente, então i2DL3=1, caso contrário i2DL3=0
Se 3DL1=presente e Bw4=presente, então i3DL1=1, caso contrário i3DL1=0
Se 3DL2=presente e A11=presente ou A3=presente, então i3DL2=1, caso contrário i3DL2=0
<b>Interação KIR-KIRL missing</b>
Se 2DL1=presente e C2=ausente, então, m2DL1=1, caso contrário, m2DL1=0
Se 2DL2=presente e C1= ausente, então, m2DL2=1, caso contrário, m2DL2=0
Se 2DL3=presente e C1= ausente, então, m2DL3=1, caso contrário, m2DL3=0
Se 3DL1=presente e Bw4= ausente, então, m3DL1=1, caso contrário, m3DL1=0
Se 3DL2=presente e A11= ausente e A3= ausente, então, m3DL2=1, caso contrário, m3DL2=0
<b>Missing KIR Score (mKIR)</b> = m2DL1 + m2DL2 + m2DL3 + m3DL1 + m3DL2
<b>Inhibitory KIR Score (iKIR)</b> = i2DL1 + i2DL2 + i2DL3 + i3DL1 + i3DL2
<b>Calculate IM-KIR Score</b> = mKIR + iKIR

Fonte: Modificado de Krieger e colaboradores, 2021<sup>98</sup>.

- b. CF-iKIR *score*: o *score* foi calculado conforme publicado por Boelens e colaboradores. Nesse *score*, os genes inibitórios KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR3DL1 tiveram suas interações com os respectivos ligantes classificadas e pontuadas conforme Tabela 3 e equação abaixo.

**Tabela 3** - Interações do CF-KIR *Score*

<b>Classificação</b>	<b>Interação</b>
KIR2DL1 funcional	KIR2DL1 & HLA-C2
KIR2DL2 funcional forte	KIR2DL2 & (HLA-C1 ou -B76 ou -B73)
KIR2DL2 funcional fraco	KIR2DL2 & HLA-C2
KIR2DL3 funcional	KIR2DL3 & (HLA-C1 ou -B76 ou -B73)
KIR3DL1 funcional	KIR3DL1 & Bw4

$$CF-iKIR \text{ score} = (1 \text{ se } 2DL1 \text{ funcional}) + (1 \text{ se } 2DL2 \text{ funcional forte or } 0,5 \text{ se } 2DL2 \text{ funcional fraco}) + (0,75 \text{ se } 2DL3 \text{ funcional}) + (1 \text{ se } 3DL1 \text{ funcional}).$$

- c. CF-iKIR *score* modificado: a partir dos dados de KIR3DL1 em alta resolução não considerados pelo CF-iKIR *score*, nós propusemos uma modificação no *score*



pontuando a interação do alelo KIR3DL1 com o epítipo Bw de acordo com a equação abaixo.

$$CF-iKIR \text{ score modificado} = (1 \text{ se } 2DL1 \text{ funcional}) + (1 \text{ se } 2DL2 \text{ funcional forte or } 0,5 \text{ se } 2DL2 \text{ funcional fraco}) + (0,75 \text{ se } 2DL3 \text{ funcional}) + (KIR3DL1-Bw4, 1 \text{ se par inibitório forte, } 0,5 \text{ se par inibitório fraco e } 0 \text{ se par não inibitório}).$$

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma análise descritiva geral da coorte foi realizada com apresentação das medianas ou proporções de acordo com as características das variáveis. As proporções foram comparadas entre grupos independentes de acordo com o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram comparadas entre dois grupos independentes por meio do teste de Mann-Whitney e descritas como medianas com intervalo interquartil<sup>111</sup>. A normalidade foi avaliada pela inspeção visual dos histogramas. As variáveis categóricas foram descritas com contagens e proporções<sup>112</sup>.

Funções de incidência cumulativa foram computadas para o desfecho primário recaída, mortalidade relacionada ao transplante, doença do enxerto contra o hospedeiro crônica e aguda grau II-IV no cenário de risco competitivo. As curvas de incidência cumulativa foram estimadas pelo método descrito por Kalbfleisch e Prentice, considerando causas competitivas<sup>26</sup>. A diferença entre curvas de incidência cumulativa, na presença de risco competitivo, foi testada usando o método de Gray<sup>27</sup>.

A incidência cumulativa de recaída, definida conforme anteriormente como tempo entre o transplante e recaída, foi calculada considerando morte como risco competitivo.

Estimativas de incidência de DECH aguda e crônica foram calculadas usando morte como risco competitivo, enquanto para a mortalidade relacionada ao transplante foi usada a recaída ou progressão.

Todos os desfechos tempo para evento foram censuradas na data do último contato. Curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier, e o teste log-rank foi usado para avaliar diferenças entre as curvas.

O efeito de covariáveis nos desfechos tempo-dependentes foi avaliado aplicando o modelo de *Cox proportional hazards* e, nos desfechos com risco competitivo, foi aplicado o modelo de regressão Fine-Gray (FG)<sup>113,114</sup>. Covariáveis com  $p < 0,15$  na análise de regressão FG univariada foram incluídas na análise de regressão múltipla com o método de eliminação de *backward* ( $p < 0,10$ ). As variáveis clínicas incluídas no modelo foram: idade do paciente, idade do doador, HCT-CI, tipo de doador, gênero, *status* CMV do paciente e doador, DRI.

O processo de *backward selection* conduzido permite que o tamanho da amostra se ajuste e sempre usa o máximo de amostra disponível à medida que o número de variáveis no modelo cai<sup>115</sup>. Foram avaliadas as possíveis interações entre as variáveis que permaneceram no modelo final de eliminação de *backward*, incluindo termos de interação no modelo.

As covariáveis contínuas foram dicotomizadas para encontrar um valor de corte ótimo usando o método de Contal e O'Quigley, que é baseado no teste de log-rank. Esse método, essencialmente, calcula todas as divisões possíveis e encontra aquela que maximiza a estatística log-rank<sup>116,117</sup>. *Hazard Ratios* (HR) foram relatados com intervalos de confiança de 95%.

A mediana do tempo de seguimento com IC95% foi calculada usando uma curva reversa de sobrevida global de Kaplan-Meier, que foi construída invertendo "censor" e "evento", ou seja, evento (morte) torna-se censor enquanto censor torna-se o desfecho<sup>118-120</sup>.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS versão 9.4 (*SAS Institute Inc*, Cary, NC). Todos os testes foram de 2 lados, sendo considerado significativo  $P < 0,05$ .

### 3.11 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes forneceram consentimento informado de acordo com a Declaração de Helsinki e foram recrutados por protocolos de transplante aprovados pelo Comitê de Ética da Stanford University. O protocolo com o regime de condicionamento TLI-ATG já previa uso dos dados clínicos e amostras para estudos subsequentes dessa coorte, sendo esse projeto incorporado ao protocolo inicial.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

No período de janeiro de 2007 a janeiro de 2017, 381 transplantes de doadores HLA-compatíveis aparentados e não aparentados foram realizados no Stanford Hospital com o regime de condicionamento TLI-ATG. Em nove casos, amostras de DNA do doador não estavam disponíveis para tipificação KIR e foram excluídas. Desse modo, 372 amostras foram submetidas à tipificação, sendo que, dessas, 19 reações não obtiveram profundidade suficiente de sequenciamento e esses casos também foram excluídos da análise. Dez doadores tiveram falha em parte significativa da análise genotípica e foram excluídos da análise.

### 4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Dentre os 343 pacientes cujos doadores foram avaliados para genotipagem *KIR*, a mediana de idade foi de 61 anos (22-77a), 57,7% do sexo masculino e 81,3% de caucasianos (Tabela 4). Dentre as neoplasias hematológicas de linhagem mieloide (N=180), a LMA foi a mais frequente, correspondendo a 60% (n=108) dos diagnósticos, e síndrome mielodisplásica 40% (n=72). Dentre as neoplasias de linhagem linfoide (n=163), 58,9% (n=96) foi de linfoma não Hodgkin, 28,2% (n=46) de leucemia linfoide crônica e 12,9% (n=21) de linfoma de Hodgkin. O índice de risco da doença (*Disease risk index*, DRI) variou de acordo com o grupo de doença: nas doenças mieloides, 97,2% dos pacientes tinham DRI alto ou muito alto e, nas doenças linfoides, 63,8%. Cento e oitenta e oito pacientes (54,8%) tiveram doador não aparentado HLA-compatível 10x10.

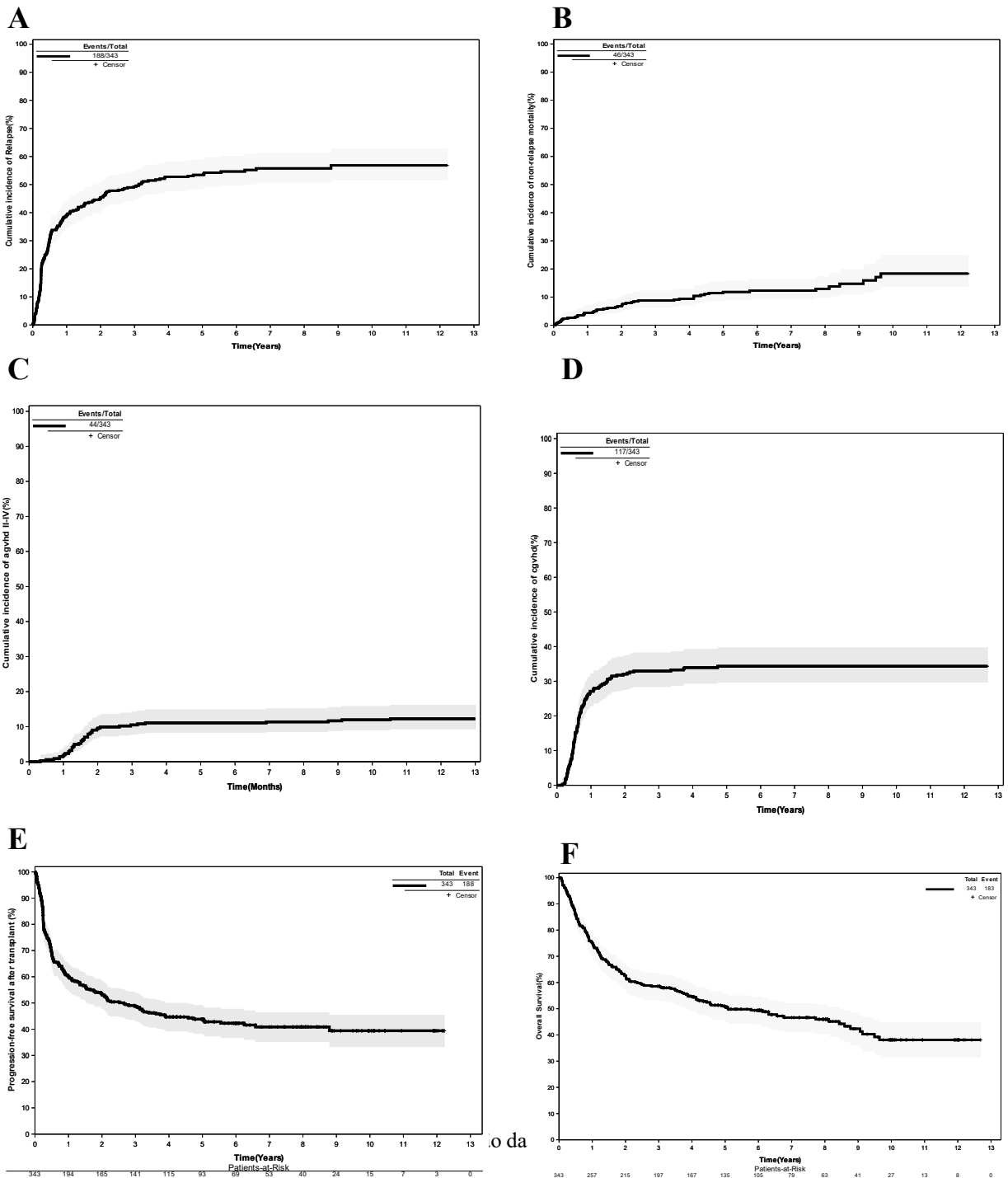
**Tabela 4 -** Características clínicas da coorte

	<b>N(%)</b>
<b>Idade</b>	61 (22-77)
<b>Gênero</b>	
<i>Masculino</i>	198 (57,7)
<b>Raça</b>	
<i>Caucasiana</i>	279 (81,3)
<i>Asiática</i>	34 (9,9)
<i>Negra</i>	3 (0,3)
<b>HCT-CI</b>	
0-2	205 (59,8)
>2	138 (40,2)
<b>Diagnóstico</b>	
<i>LMA</i>	108 (31,5)
<i>SMD</i>	72 (21)
<i>LNH</i>	96 (28)
<i>LLC</i>	46 (13,4)
<i>LH</i>	21 (6,1)
<b>Índice risco doença (DRI)</b>	
<i>Baixo</i>	64 (18,7)
<i>Alto</i>	186 (54,2)
<i>Muito alto</i>	93 (27,1)
<b>Status pré-transplante</b>	
<i>Resposta completa</i>	208 (61,7)
<i>Resposta parcial</i>	92 (27,3)
<i>Doença em atividade</i>	37 (11)
<b>Tipo de doador</b>	
<i>Aparentado</i>	155 (45,2)
<i>Não aparentado</i>	188 (54,8)
<b>Idade do doador (anos)</b>	<b>43 (17-76)</b>
<i>Aparentado</i>	44 (17-76)
<i>Não Aparentado</i>	42 (17-59)
<b>Gênero doador -&gt; receptor</b>	
<i>Feminino -&gt; Masculino</i>	90 (26,2)
<i>≠ Feminino -&gt; Masculino</i>	253 (73,8)
<b>Sorologia CMV doador/receptor (D/R)</b>	
<i>D/R compatível</i>	214 (62,8)
<i>D-/R+</i>	76 (22,3)
<i>D+/R-</i>	51 (15)

A mediana de seguimento calculada via estimador reverso de Kaplan-Meier foi de 7 anos (IC 95% 6,1-7,8). Em dois anos, a incidência cumulativa de recaída foi de 45,2% (IC 95%, 40,2-50,8) e a mortalidade não relacionada ao transplante foi de 6,7% (IC 95%, 4,5-10). A incidência cumulativa de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda grau II a IV em 2 anos foi de 12,8% (IC 95%, 9,7-16,9) e de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica foi de 32,1% (IC 95%, 27,5-37,4) conforme ilustra o Gráfico 2.

A sobrevida global foi de 62,7% (IC 95%, 57,3-67,6) e 50,6% (IC95%, 45,1-55,9) em dois e cinco anos, respectivamente. A sobrevida livre de progressão em dois anos foi de 43,8% (IC 95%, 38,2-49,2%).

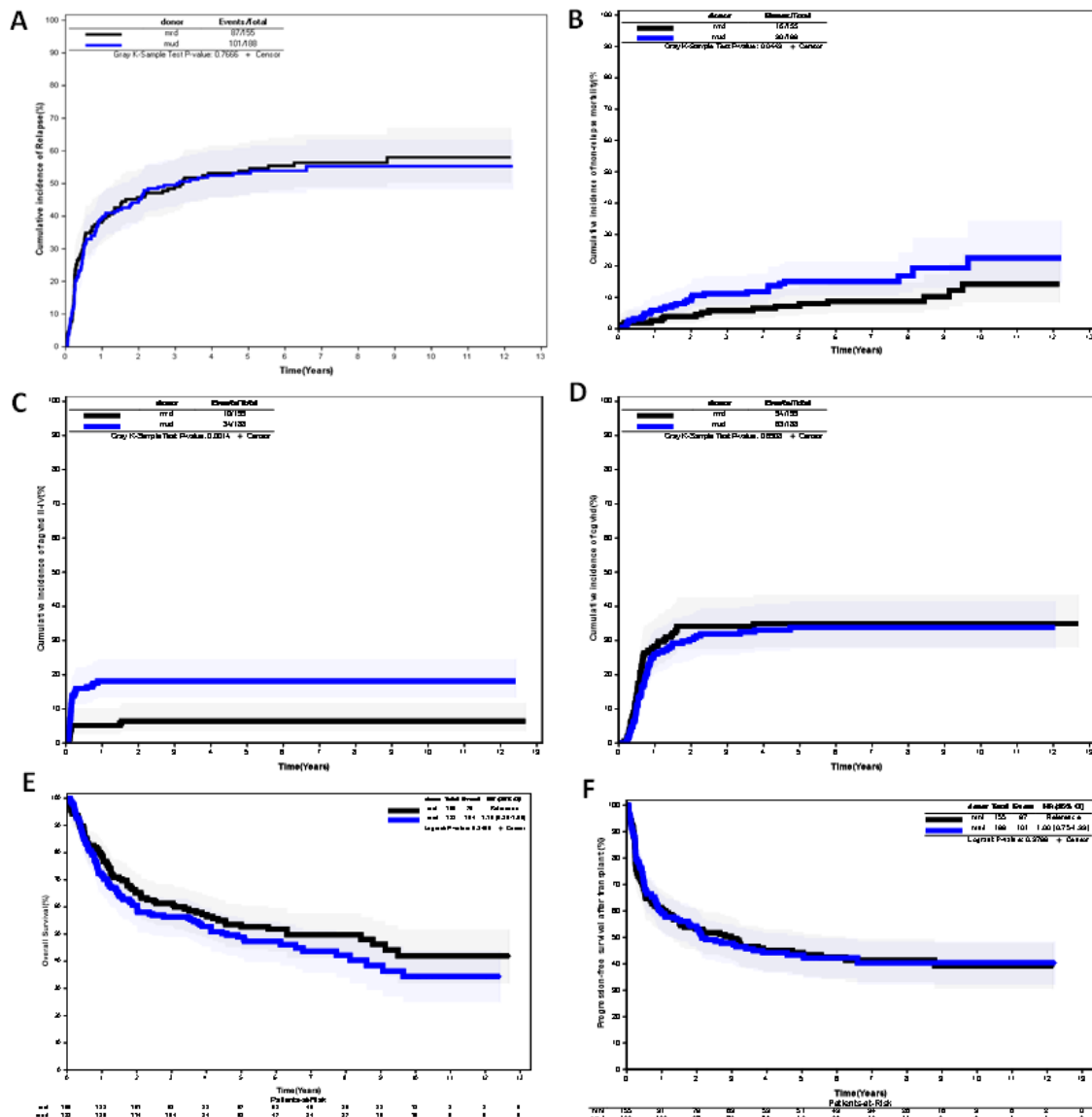
**Gráfico 2** - Desfechos clínicos da coorte. A, recaída. B, mortalidade não relacionada ao transplante. C, DECH aguda II-IV. D, DECH crônica. E, sobrevida livre de progressão. F, sobrevida global.



### 4.2.1 Desfechos de acordo com o tipo de doador

Não houve diferença de acordo com o tipo de doador na incidência de recaída, sobrevida global, sobrevida livre de progressão e doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (Gráfico 2). A mortalidade não relacionada à recaída em 1 ano foi maior nos doadores não aparentados (5,9 anos vs. 2,6 anos,  $p=0.045$ ). A incidência de doença do enxerto aguda grau II-IV também foi maior nos transplantes de doadores não aparentados (18,1% vs. 5,2%,  $p=0.001$ ).

**Gráfico 3** - Desfechos clínicos de acordo com tipo de doador. Linha azul: doador não aparentado HLA-compatível 10x10, linha preta: doador aparentado. A, recaída. B, mortalidade não relacionada ao transplante. C, DECH aguda II-IV. D, DECH crônica. E, sobrevida livre de progressão. F, sobrevida global.

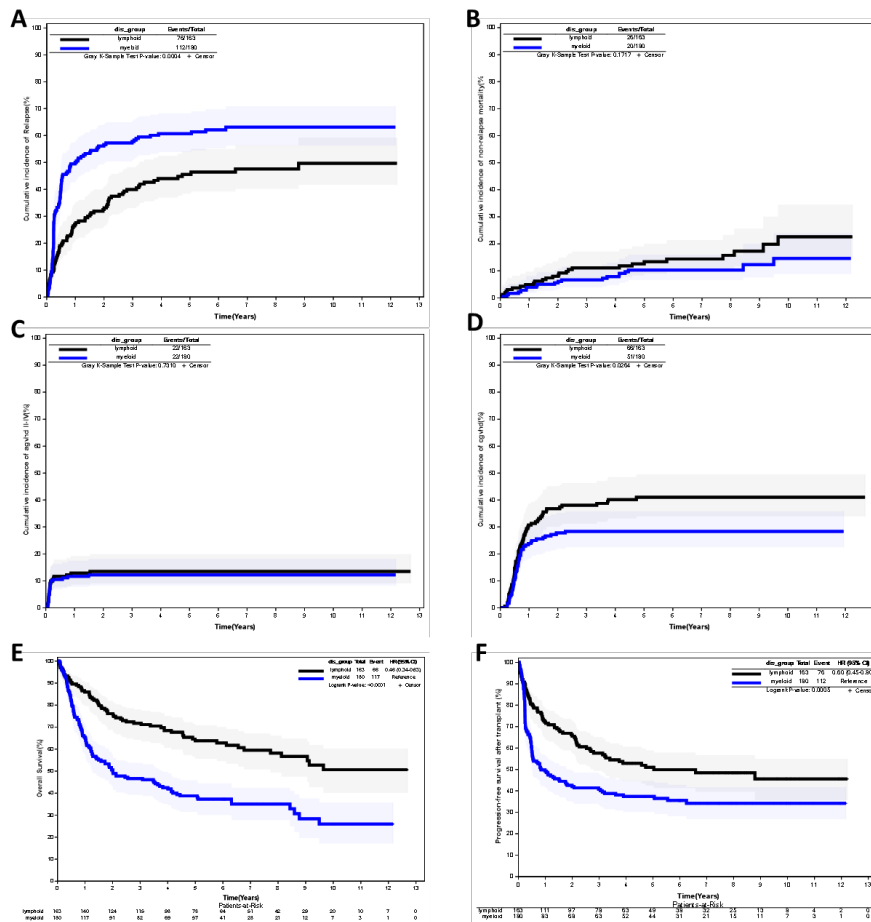


Fonte: Produção da autora (2023).

### 4.2.2 Desfechos de acordo com o grupo de doença

A incidência de recaída em 2 anos foi superior nas doenças mieloides em comparação às linfoides (56,7% vs. 32,5%,  $p < 0.001$ ). A incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica foi superior no grupo de doença linfóide (36,8% vs. 27,8%,  $p = 0.0264$ ). A sobrevida global e a sobrevida livre de progressão em 2 anos foram de 76,1% e 66,2% no grupo de doença linfóide e 50,6% e 42% no grupo de doença mieloide, respectivamente ( $p < 0.001$ ). Mortalidade não relacionada à recaída e DECH aguda grau II-IV não apresentaram diferença entre os dois grupos (Gráfico 3).

**Gráfico 4 -** Desfechos clínicos de acordo com grupo de doença. Linha azul, doença mieloide e linha preta, doença linfóide. A, recaída. B, mortalidade não relacionada ao transplante. C, DECH aguda II-IV. D, DECH crônica. E, sobrevida livre de progressão. F, sobrevida global.



Fonte: Produção da autora (2023).



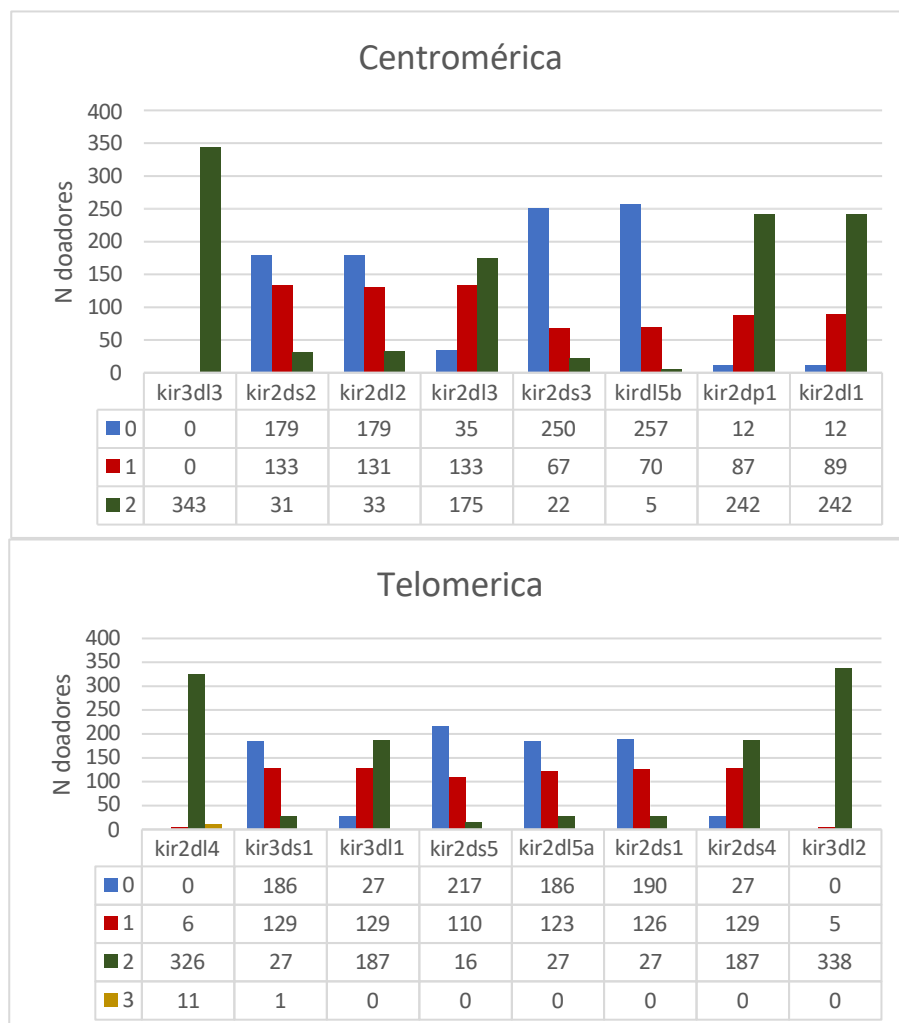
### 4.3 GENOTIPAGEM *KIR*

As amostras de 343 doadores foram analisadas. Para avaliação alélica, foram avaliados os genes: *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR3DL1S1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS1*, *KIR2DL23*, *KIR2DL5*, *KIR2DL1* e *KIR2DL4*. Não foi possível a avaliação alélica para os genes *KIR2DS35* e *KIR2DS4*.

#### 4.3.1 Número de cópias

A distribuição do número de cópias em cada gene está apresentada no Gráfico 5. Não houve diferença no número de cópias de *KIR2DS2* e *KIR2DS4* de acordo com o tipo de doador.

**Gráfico 5** - Distribuição do número de cópias dos genes de cada região: centromérica e telomérica

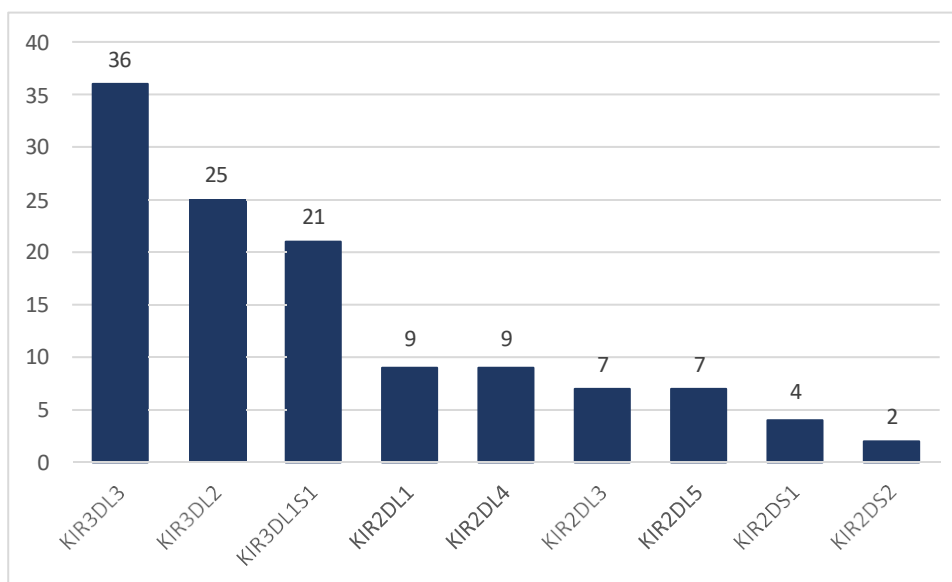


Fonte: Produção da autora (2023).

### 4.3.2 Alelos *KIR*

O número de alelos identificados para cada gene *KIR* está apresentado no Gráfico 6. Os genes *KIR2DS1* e *KIR2DS2* foram os mais monomórficos, com poucos alelos representados. Os alelos do gene *KIR2DL5* são apresentados de acordo com a região, *KIR2DL5a* representa o gene presente na porção telomérica e *KIR2DL5B*, o da porção centromérica.

**Gráfico 6** - Número de alelos observados para cada gene *KIR* (resolução 3 dígitos)

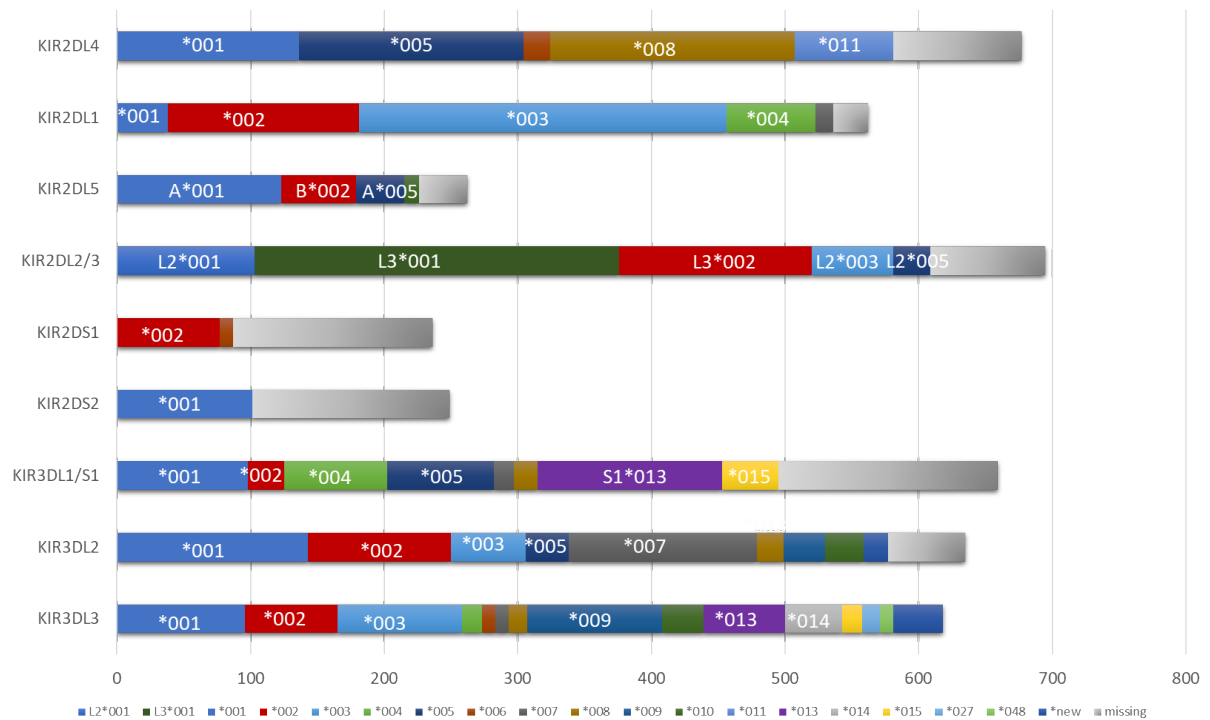


Fonte: Produção da autora (2023).

Os alelos identificados na genotipagem para cada gene *KIR* estão ilustrados no Gráfico

7.

**Gráfico 7 -** Representação alélica dos genes *KIR* expressos em, pelo menos, 10 pacientes da coorte.



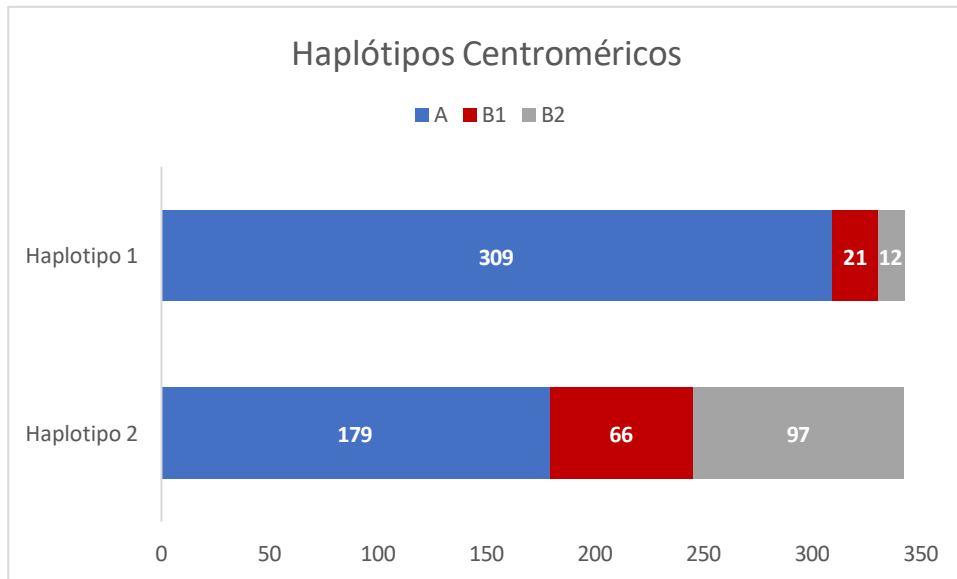
Fonte: Produção da autora (2023).

Os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS1* tiveram um percentual elevado de alelos que não puderam ser identificados pela tipificação, 58% e 60%, respectivamente. Dentre os doadores avaliáveis, os alelos *KIR2DS2*\*001 e *KIR2DS1*\*002 foram os mais frequentes para cada *locus*.

A presença de possíveis alelos novos foi identificada em todos os *loci* avaliados e mais frequente nos genes *KIR3DL3* (10%) e *KIR3DL2* (6,28%).

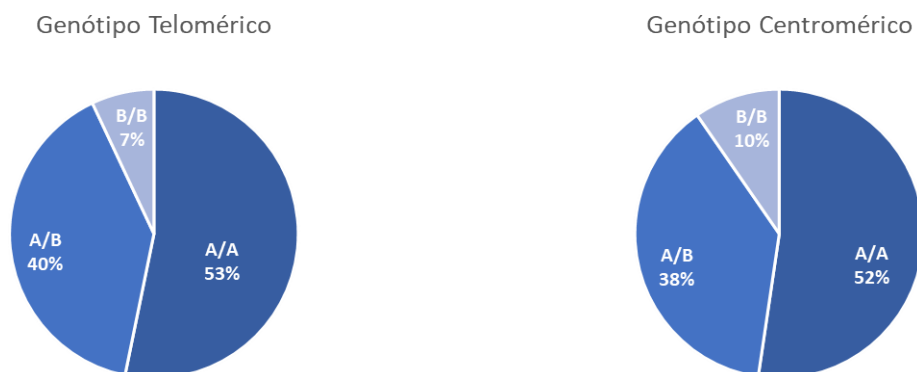
### 4.3.3 Classificação genotípica

A genotipagem KIR dos doadores foi avaliada de acordo com as regiões centromérica e telomérica. Considerando a porção centromérica, 309 doadores apresentavam, ao menos, um haplótipo A, 80 apresentavam o haplótipo B1 e 97 doadores, o haplótipo B2 (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Classificação dos haplótipos dos doadores

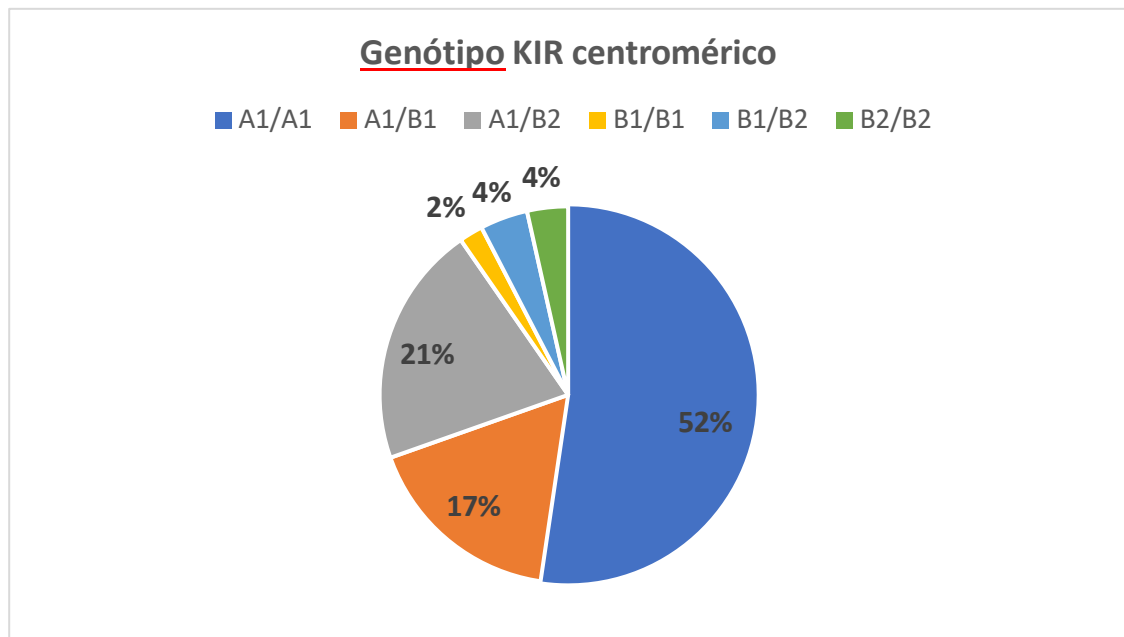
Fonte: Produção da autora (2023).

A classificação genotípica por região de acordo com a presença de haplótipos A e B é apresentada no Gráfico 9. A maioria da coorte foi composta por doadores homocigotos A/A tanto na porção telomérica (53%) quanto na porção centromérica (52%).

**Gráfico 9** - Frequência dos genótipos teloméricos e centroméricos

Fonte: Produção da autora (2023).

O genótipo KIR final foi classificado de acordo com os subtipos do haplótipo B centromérico e a distribuição é representada no Gráfico 10. Entre os 130 doadores heterocigotos, 45% (n=59) apresentavam o haplótipo B1 e 55% (n=71), o haplótipo B2.

**Gráfico 10** - Genótipo KIR centromérico dos doadores

Fonte: Produção da autora (2023).

Embora limitada pelo número pequeno de pacientes não caucasianos, a frequência de homocigotos A/A foi superior nesse grupo com 67,5% nos não caucasianos e 70% nos asiáticos quando comparados à frequência nos caucasianos (51%).

Trinta e cinco doadores tiveram número de cópias dos genes KIR que comporiam haplótipos complexos e foram classificados de acordo com genótipo mais próximo conforme descrito na literatura. Um genótipo não teve equivalente próximo atribuído e não foi classificado (Figura 12).

**Figura 12** - Genótipos que diferem da estrutura comum dos haplótipos KIR devido a duplicações e deleções no número de cópias dos genes. O número de cópias varia de 0-4 e é representado pelo número em cada célula assim como pelo gradiente de cor. N é o número de genótipos encontrados com a mesma estrutura e Cen/Tel mostra o genótipo atribuído para análise.

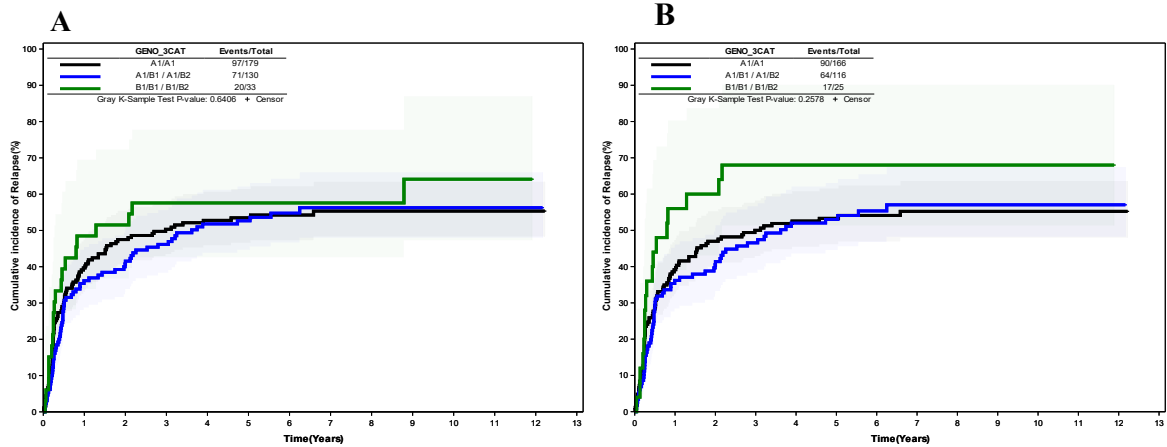
N	Cen	Tel	3dl3	2ds2	2dl2	2dl3	2ds3	2dl5b	2dp1	2dl1	3dp1	2dl4	3ds1	3dl1	2ds5	2dl5a	2ds1	2ds4	3dl2	2dl5
2	A/A	A/B	2	0	0	1	0	0	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1
1	A/A	A/B	2	0	0	1	0	NA	2	2	2	3	1	2	0	NA	0	2	2	0
1	A/A	A/B	2	0	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	2	2	0
1	A/A	A/B	2	0	0	2	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
2	A/A	A/B	2	0	0	2	0	0	2	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
1	A/A	A/B	2	0	0	2	0	0	3	2	2	3	2	1	2	2	1	1	2	2
1	A/A	A/B	2	0	0	2	0	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
1	A/A	A/A	2	0	0	2	0	0	2	2	2	3	0	2	0	0	0	2	2	0
1	A/A	B/B	2	0	0	2	0	NA	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2	3
1	A/A	B/B	2	0	0	2	0	0	2	2	2	2	2	0	1	2	2	0	2	2
1	A/B1	A/B	2	1	1	1	3	NA	3	2	2	3	3	0	1	NA	2	0	2	4
3	A/B1	A/B	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	1	2	0	0	0	2	2	1
2	A/B1	A/B	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	0	1	1	1	2	3
1	A/B1	A/B	2	1	1	1	1	NA	2	2	2	3	1	2	0	NA	0	2	2	1
1	A/B1	A/B	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	2	1	1	2	1	1	2	3
1	A/B1	A/B	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	2	2
1	A/B1	A/A	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	0	2	0	0	0	2	2	1
1	A/B2	A/A	2	1	1	0	0	1	1	1	2	2	0	1	0	0	0	2	2	1
1	A/B2	A/B	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	2	1
1	A/B2	B/B	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	1	2	0	2	2
1	A/B2	B/B	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	1	2	0	2	2
1	B1/B1	A/A	2	1	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	2	2	2
1	B1/B1	B/B	2	2	2	0	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2	3
1	B1/B2	A/B	2	2	2	0	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
1	B1/B2	A/A	2	2	2	0	1	1	1	1	2	2	1	2	0	0	0	2	2	1
1	B1/B2	A/A	2	1	2	0	1	1	1	1	2	2	0	2	0	0	0	2	2	1
1	B1/B2	B/B	2	2	2	0	1	1	1	1	2	2	2	0	1	2	2	0	2	3
1	B2/B2	A/B	2	2	2	0	0	1	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
1	B2/B2	A/B	2	2	1	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1
1			2	1	2	0	2	1	1	1	2	2	1	0	1	1	2	0	2	2

Fonte: Produção da autora (2023).

#### 4.4 CORRELAÇÃO DO GENÓTIPO COM OS DESFECHOS CLÍNICOS

A avaliação do impacto do genótipo do doador na incidência acumulada de recaída em dois anos nos grupos A/A, A/B e B/B foi de 47,5%, 40,8% e 51,5%. Quando excluídos os doadores com genótipos complexos, a incidência nos grupos se mantém para os grupos A/A e A/B em 47%, 40,5%, e aumento para 60% no grupo B/B, embora não haja diferença estatística ( $p=0,25$ ), como mostra o Gráfico 11.

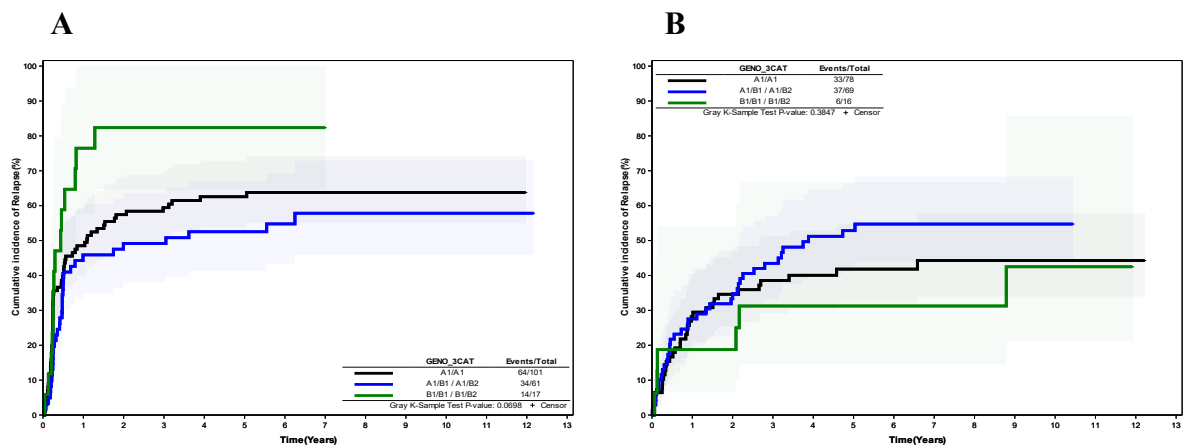
**Gráfico 11** - Impacto do genótipo KIR no desfecho recaída. Linha preta, A/A. Linha azul A/B. Linha verde B/B. A) Amostra total (N=342). B) Exclusão dos genótipos complexos (N= 307).



Fonte: Produção da autora (2023).

O Gráfico 12 mostra a incidência de recaída em dois anos de acordo com o subgrupo de doença. Nas doenças mieloides, foi de 57,4%, 49,2% e 82,4% enquanto nas doenças linfoides foi de 34,6%, 33,3% e 18,8% nos grupos A/A, A/B e B/B, respectivamente (p=0,08, p=0,38).

**Gráfico 12** - Incidência acumulada de recaída de acordo com subgrupo de doença. Gráfico A – doenças mieloides e Gráfico B – doenças linfoides. Linha preta, A/A. Linha azul A/B. Linha verde B/B.



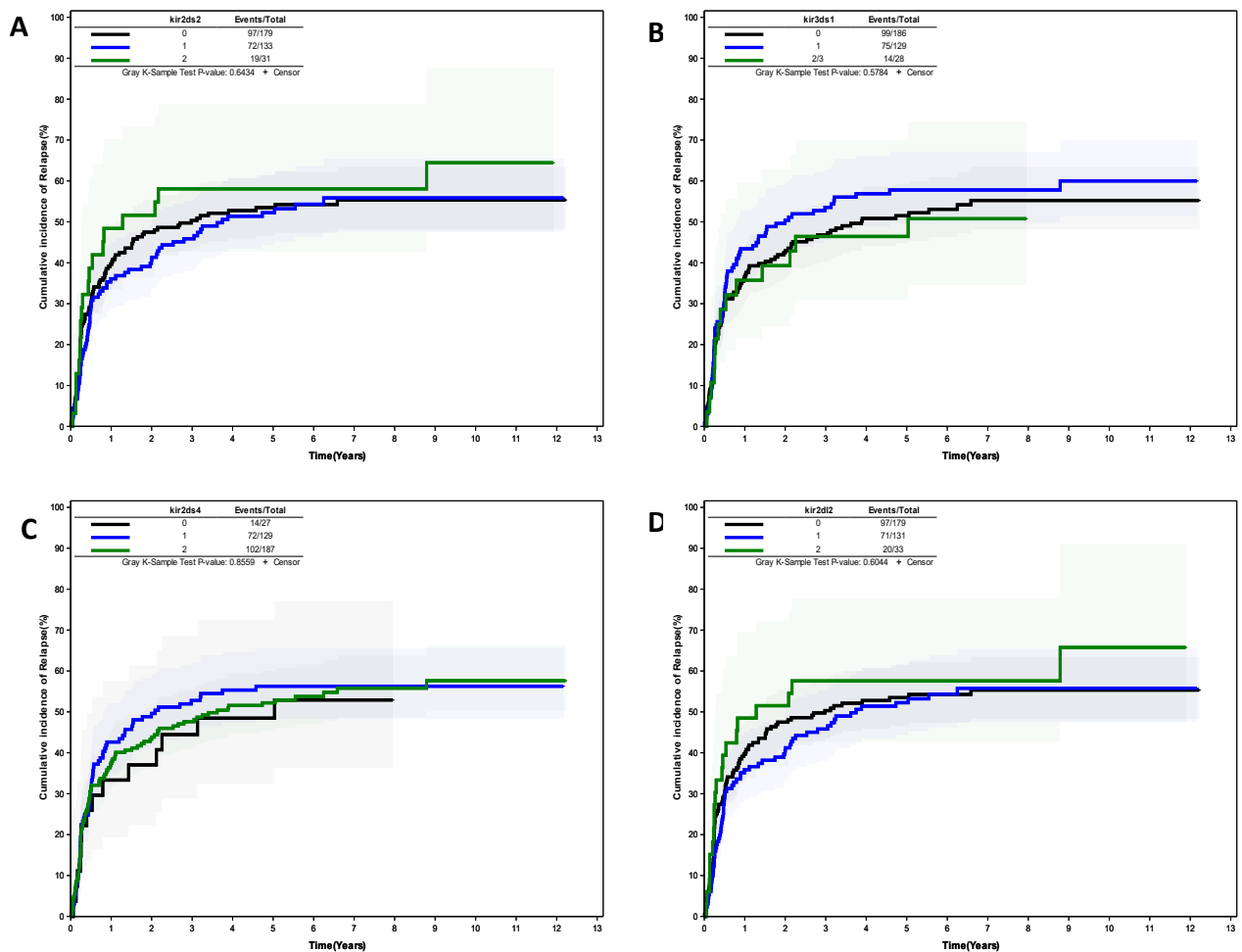
Fonte: Produção da autora (2023).

Não houve diferença entre os genótipos AA e B/x nos desfechos secundários de sobrevida global, sobrevida livre de progressão, mortalidade não relacionada ao transplante, DECH aguda II-IV e DECH crônica. Para todos os desfechos, a análise com a exclusão dos genótipos complexos não mostrou diferença significativa.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE RECAÍDA POR NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES *KIR*

O número de cópias dos genes *KIR2DS2*, *KIR3DS1*, *KIR2DS4*, e *KIR2DL2* foi avaliado em relação à associação com a incidência de recaída e, em nenhum deles, foi encontrada (Gráfico 13).

**Gráfico 13** - Recaída por número de cópias dos genes: A, *KIR2DS2*. B, *KIR3DS1*. C, *KIR2DS4*. D, *KIR2DL2*. Linha preta ausente, linha azul 1 cópia, linha verde 2 cópias do gene.



Fonte: Produção da autora (2023).

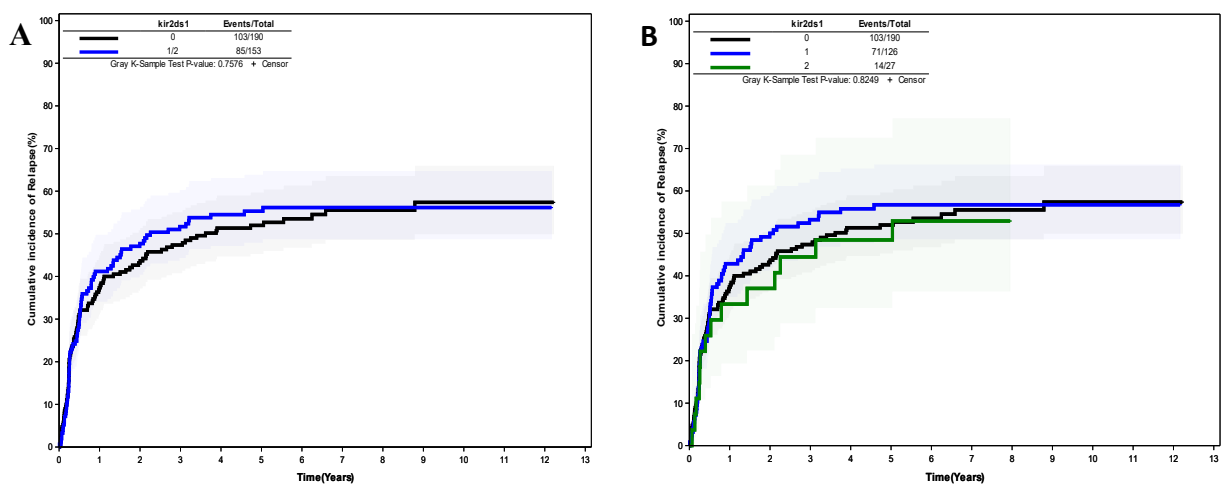


## 4.6 MODELOS KIR

### 4.6.1 Modelo KIR2DS1 – HLA-C

Inicialmente, foi avaliada a associação da presença do gene *KIR2DS1* e do seu número de cópias na incidência cumulativa de recaída, não sendo encontrada em ambos os cenários (Gráfico 14).

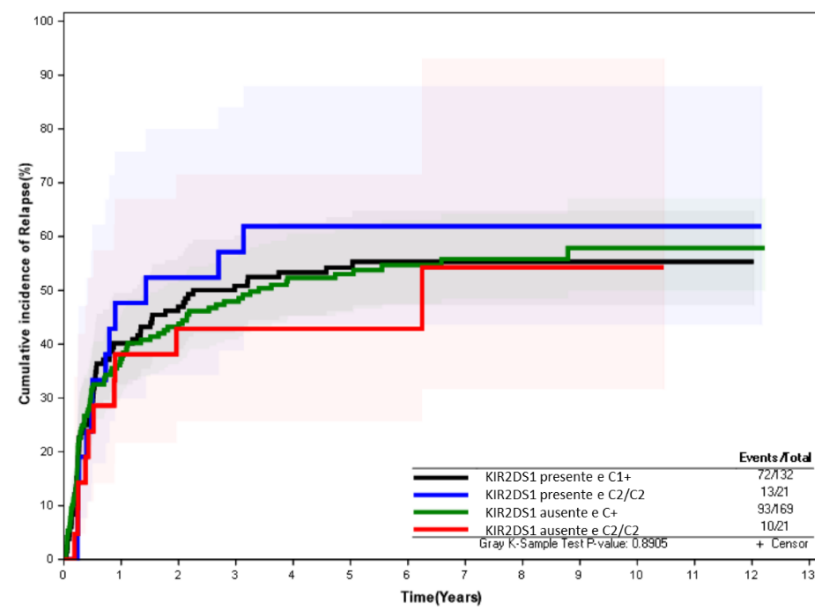
**Gráfico 14** - Incidência de recaída de acordo com a presença do gene *KIR2DS1* (A) e pelo número de cópias (B). A) Linha preta ausente, linha azul presente. B) Linha preta nenhuma cópia, linha azul uma cópia, linha verde 2 cópias.



Fonte: Produção da autora (2023).

Em seguida, foi avaliada a interação do gene *KIR2DS1* do doador, independentemente do número de cópias, com o ligante HLA-C do receptor (Gráfico 15) na incidência de recaída. Não houve diferença na incidência cumulativa de recaída entre os grupos homozigotos C2/C2 e C1/C1 ou C1/C2 na presença e na ausência de *KIR2DS1*.

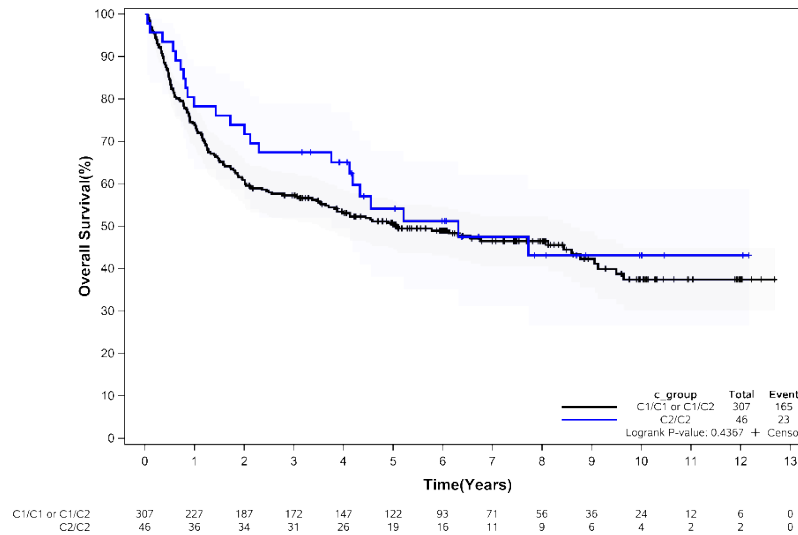
**Gráfico 15** - Incidência de recaída de acordo com a presença de *KIR2DS1* e os ligantes do grupo C. Linha preta, *KIR2DS1* presente com C1/C1 ou C1/C2. Linha azul, *KIR2DS1* presente com C2/C2. Linha verde, *KIR2DS1* ausente com C1/C1 ou C1/C2. Linha vermelha, *KIR2DS1* ausente com C2/C2.



Fonte: Produção da autora (2023).

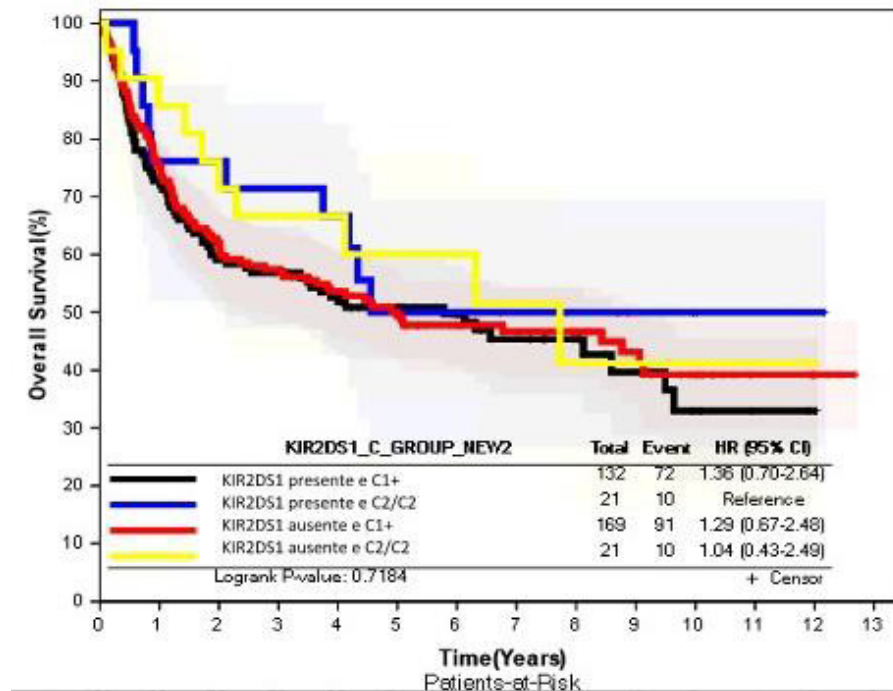
O desfecho sobrevida global foi avaliado, analisando o impacto do grupo homozigoto C2/C2 (Gráfico 16), seguido da interação dos grupos HLA-C com a presença ou ausência de *KIR2DS1* (Gráfico 17). Em ambas as análises, não houve diferença nas taxas de sobrevida global entre os grupos.

**Gráfico 16** - Sobrevida global de acordo com grupo HLA-C. Linha preta, C1/C1 ou C1/C2. Linha azul, C2/C2.



Fonte: Produção da autora (2023).

**Gráfico 17** - Sobrevida global de acordo com o modelo KIR2DS1-grupo HLA-C. Linha preta, *KIR2DS1* positivo com C1/C1 ou C1/C2. Linha azul, *KIR2DS1* positivo com C2/C2. Linha vermelha, *KIR2DS1* negativo com C1/C1 ou C1/C2. Linha amarela, *KIR2DS1* negativo com C2/C2.

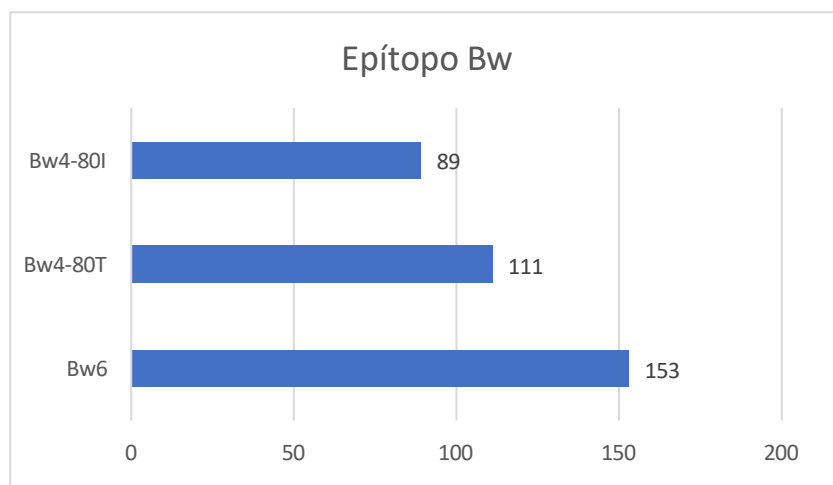


Fonte: Produção da autora (2023).

#### 4.6.2 Modelo KIR3DL1 – Bw4

Para a avaliação desse modelo, os epítomos Bw foram classificados em Bw6, Bw4-80T e Bw4-80I. A distribuição dos epítomos entre os receptores está representada no Gráfico 18. A maioria dos indivíduos era homocigota para Bw6, enquanto Bw4-80I estava presente em 25% dos pacientes.

**Gráfico 18** - Distribuição dos epítomos Bw

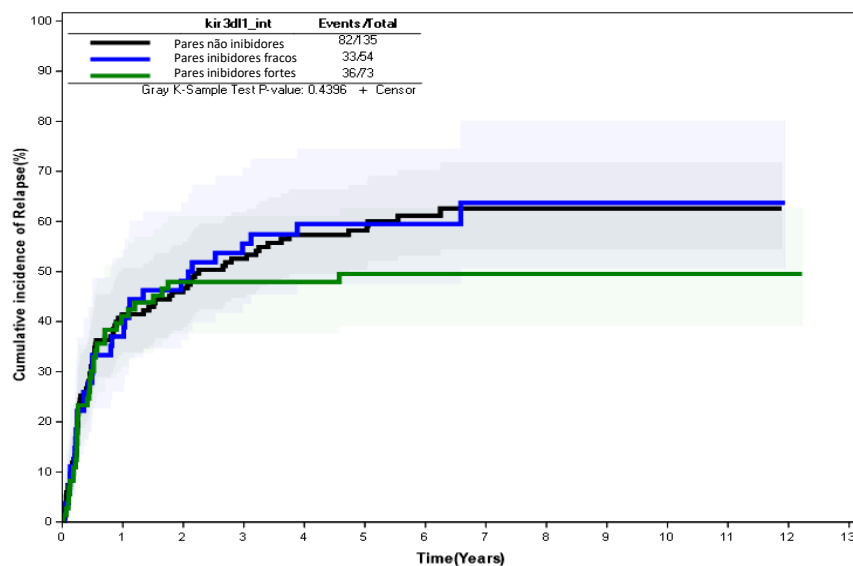


Fonte: Produção da autora (2023).

A presença do gene *KIR3DL1* foi encontrada em 263 doadores, os quais foram classificados de acordo com a densidade na superfície celular em alelos de alta, baixa ou nula expressão. A distribuição dos alelos em alta resolução é mostrada no Gráfico 19.



**Gráfico 20** - Incidência de recaída de acordo com o grau de interação entre *KIR3DL1* e HLA-B. Linha preta, pares não inibidores. Linha azul, pares inibidores fracos. Linha verde, pares inibidores fortes.



Fonte: Produção da autora (2023).

#### 4.7 IMPACTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E OS MODELOS DE ALORREATIVIDADE KIR

A análise do impacto das variáveis clínicas e dos modelos KIR na incidência de recaída após transplante identificou como características relevantes a doença linfóide (HR, 0,59, IC 95%, 0,45-0,79,  $p < 0,001$ ), o índice de risco da doença muito alto (HR, 2,03, IC 95%, 1,32-3,13,  $p = 0,001$ ) e a idade do paciente acima de 56 anos (HR, 1,65, IC 95%, 1,19-2,28,  $p = 0,003$ ).

Nenhum dos modelos KIR analisados mostrou associação com o risco de recaída (Tabela 6), de modo que apenas as variáveis clínicas foram utilizadas na análise multivariada, se mantendo como fatores de risco independentes a idade do paciente (HR, 1,51, IC 95% 1,05-2,18,  $p = 0,27$ ) e DRI muito alto (HR, 2,08 IC 95% 1,30-3,35,  $p = 0,002$ ).

Os modelos KIR também não tiveram associação com sobrevida global, mortalidade não relacionada à recaída, e DECH aguda e crônica. Fatores de risco independentes para sobrevida global identificados nessa coorte de pacientes foram idade do paciente (HR 1,74, IC 95% 1,20-2,51,  $p = 0,003$ ) e o subgrupo de doenças, com doença linfóide apresentando maior sobrevida global (HR 0,56, IC 95% 0,41-0,77,  $p < 0,001$ ). Para DECHa, doador não relacionado (HR 2,98, IC 95% 1,47-6,02,  $p = 0,002$ ) foi o único fator de risco identificado na análise multivariada.

**Tabela 6 -** Análise univariada com os modelos KIR na população do estudo

	N	RECAÍDA HR (IC 95%)	P	SG HR (IC 95%)	P	MNR HR (IC 95%)	P	DECHA HR (IC 95%)	P	DECHC HR (IC 95%)	P
<i>Receptor-ligante</i>											
No	263	1		1		1		1		1	
Yes	80	1.25 (0.91-1.73)	0.17	1.08 (0.77-1.52)	0.65	0.58 (0.26-1.30)	0.19	1.42 (0.74-2.71)	0.29	0.91 (0.58-1.44)	0.70
<i>Haplótipo telomérico</i>											
A/A	182	1		1		1		1		1	
B/x	153	1.07 (0.8 – 1.43)	0.65	1.07 (0.80-1.43)	0.67	0.81 (0.46-1.45)	0.49	1.24 (0.68-2.25)	0.47	0.92 (0.64-1.34)	0.69
<i>Haplótipo Centromérico</i>											
A/A	179	1		1		1		1		1	
B/x	163	1.0 (0.75-1.33)	1.0	0.83 (0.62-1.11)	0.20	0.93 (0.52-1.65)	0.80	1.23 (0.68-2.22)	0.49	0.91 (0.63-1.31)	0.60
<i>Genótipo Centromérico</i>											
A/A	179	1		1		1		1		1	
A/B	130	0.95 (0.7-1.29)	0.75	0.80 (0.59-1.10)	0.17	1.00 (0.55-1.83)	0.99	1.06 (0.55-2.02)	0.86	0.95 (0.65-1.39)	0.77
B/B	33	1.21 (0.74-2.0)	0.45	0.94 (0.56-1.58)	0.83	0.63 (0.19-2.14)	0.46	1.96 (0.83-4.65)	0.13	0.76 (0.37-1.56)	0.46
<i>KIR2DS1/HLA-C</i>											
KIR2DS1+/C2	21	1		1		1		1		NA	
KIR2DS1-/C1+	169	0.89 (0.52-1.55)	0.69	1.29 (0.67-2.48)	0.94	3.32 (0.46-23.91)	0.23	0.65 (0.19-2.24)	0.49	1.04 (0.71-1.52)*	0.85
KIR2DS1-/C2	21	0.72 (0.33-1.58)	0.42	1.04 (0.43-2.49)	0.93	6.03 (0.73-49.62)	0.09	1.69 (0.41-6.97)	0.47	NA	
KIR2DS1+/C1+	132	0.9 (0.52-1.57)	0.71	1.36 (0.70-2.64)	0.36	2.80 (0.38-20.58)	0.31	1.04 (0.31-3.52)	0.95	-	
<i>KIR3DL1/Bw4</i>											
Par não inibitório	135	1		1		1		1		1	
Par inibitório fraco	54	1.02 (0.69-1.51)	0.93	1.20 (0.79-1.82)	0.38	0.96 (0.37-2.51)	0.93	1.94 (0.87-4.36)	0.10	0.64 (0.35-1.19)	0.16
Par inibitório forte	73	0.79 (0.53-1.18)	0.25	1.05 (0.72-1.53)	0.80	1.76 (0.88-3.50)	0.11	1.49 (0.65-3.41)	0.35	1.08 (0.68-1.72)	0.73

continua

conclusão

**Tabela 6 -** Análise univariada com os modelos KIR na população do estudo

	N	RECAÍDA HR (IC 95%)	P	SG HR (IC 95%)	P	MNR HR (IC 95%)	P	DECHA HR (IC 95%)	P	DECHC HR (IC 95%)	P
<i>IM KIR SCORE</i>											
<5	226	1		1		1		1		1	
=5	117	0.90 (0.67 – 1.21)	0.49	0.92 (0.68-1.25)	0.58	1.28 (0.71-2.31)	0.42	0.90 (0.48-1.69)	0.74	0.98 (0.67-1.43)	0.91
<i>CF KIR SCORE</i>											
< 1.75	88	1		1		1		1		1	
>=1.75	255	1.03 (0.75-1.43)	0.84	1.14 (0.81-1.60)	0.44	1.11 (0.57-2.16)	0.76	1.04 (0.53-2.05)	0.92	0.74 (0.50-1.11)	0.14
<i>CF KIR SCORE MOD</i>											
<2	202	1		1		1		1		1	
>=2	141	0.92 (0.69-1.23)	0.59	1.16 (0.86-1.55)	0.32	1.49 (0.84-2.64)	0.18	1.11 (0.61-2.00)	0.74	0.85 (0.58-1.22)	0.37

\*Comparação KIR2DS1+/C1+ vs. outros.



#### 4.7.1 Subgrupo mieloide

Devido ao efeito do subgrupo de doença nos desfechos, a análise foi complementada dentro de cada subgrupo. Nas doenças mieloides, as variáveis clínicas idade do paciente acima de 65 anos (HR, 2,05 IC 95% 1,35-3,11,  $p < 0,001$ ) e do doador acima de 38 anos (1,97 IC 95% 1,29-3,02,  $p = 0,002$ ) foram fatores independentes associados para o risco de recaída. Nenhum modelo KIR esteve associado ao risco de recaída.

Na avaliação de sobrevida global, a presença do par inibitório fraco no modelo KIR3DL1/Bw4 esteve associado à menor sobrevida global (HR, 1,70 IC 95% 1,05- 2,76,  $p = 0,03$ ) (Tabela 7 e Gráfico 21). O modelo CF\_KIR *score* modificado que incorpora a variação alélica de *KIR3DL1* às outras interações dos receptores inibitórios apresentou associação com sobrevida global: CF\_KIR *score* superior ou igual a 2 esteve associado à menor sobrevida global (HR, 1,56 IC 95% 1,07-2,25,  $p = 0,02$ ) (Gráfico 22). Na análise multivariada, o modelo KIR3DL1/Bw4 foi excluído e foram consideradas variáveis independentes para o desfecho sobrevida global: o diagnóstico LMA (HR, 0,65 IC 95% 0,45-0,94,  $p = 0,02$ ) e idade do paciente igual ou superior a 65 anos (HR, 1,63 IC 95% 1,12-2,35,  $p = 0,01$ ), mas não o CF\_KIR *score* modificado (HR, 1,41 IC 95% 0,97-2,05,  $p = 0,07$ ) (Tabela 8).

Tabela 7 - Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo mieloide

	N	RECAÍDA HR (IC 95%)	P	SG HR (IC 95%)	P	MNR HR (IC 95%)	P	DECHA HR (IC 95%)	P	DECHC HR (IC 95%)	P
<i>Receptor ligante</i>											
No	130	1		1		1		1		1	
Yes	50	0.94 (0.63-1.41)	0.78	0.84 (0.56-1.27)	0.42	0.63 (0.21-1.89)	0.41	1.26 (0.51-3.09)	0.62	1.44 (0.80-2.60)	0.22
<i>Haplótipo telomérico</i>											
A/A	87	1		1		1		1		1	
B/x	89	1.11 (0.76-1.60)	0.60	0.99 (0.69-1.43)	0.97	0.76 (0.32-1.82)	0.54	1.32 (0.56-3.11)	0.53	1.40 (0.80-2.46)	0.24
<i>Haplótipo Centromérico</i>											
A/A	101	1		1		1		1		1	
B/x	78	0.92 (0.64-1.34)	0.67	1.06 (0.73-1.52)	0.77	1.07 (0.44-2.55)	0.89	0.89 (0.38-2.09)	0.80	1.14 (0.66-1.96)	0.65
<i>Genótipo Centromérico</i>											
A/A	101	1		1		1		1		1	
A/B	61	0.78 (0.52-1.18)	0.24	0.94 (0.63-1.40)	0.77	1.23 (0.50-3.03)	0.66	0.62 (0.22-1.74)	0.37	1.13 (0.64-2.01)	0.67
B/B	17	1.63 (0.94-2.83)	0.08	1.61 (0.90-2.87)	0.11	0.52 (0.07-3.83)	0.52	1.96 (0.64-6.00)	0.24	0.62 (0.18-2.12)	0.45
<i>KIR2DS1/HLA-C</i>											
KIR2DS1+/C1+	74	1		1		1		1		1	
Outros	106	0.89 (0.62-1.29)	0.69	0.94 (0.65-1.36)	0.74	1.31 (0.53-3.25)	0.56	0.70 (0.30-1.60)	0.39	<b>0.36 (0.15-0.84)</b>	<b>0.018</b>
<i>KIR3DL1/Bw4</i>											
Par não inibitório	76	1		1		1		1		1	
Par inibitório fraco	33	1.35 (0.81-2.26)	0.25	<b>1.70 (1.05-2.76)</b>	<b>0.03</b>	0.99 (0.31-3.19)	0.98	2.01 (0.69-5.85)	0.120	0.50 (0.21-1.21)	0.12
Par inibitório forte	31	1.28 (0.75-2.20)	0.36	1.39 (0.85-2.29)	0.19	1.01 (0.32-3.19)	0.99	2.30 (0.77-6.89)	0.14	0.73 (0.33-1.60)	0.43
<i>IM KIR SCORE</i>											
<5	124	1		1		1		1		1	
=5	56	0.79 (0.53-1.18)	0.25	0.94 (0.64-1.39)	0.77	1.51 (0.62-3.68)	0.360	0.47 (0.16-1.39)	0.17	0.98 (0.55-1.75)	0.95

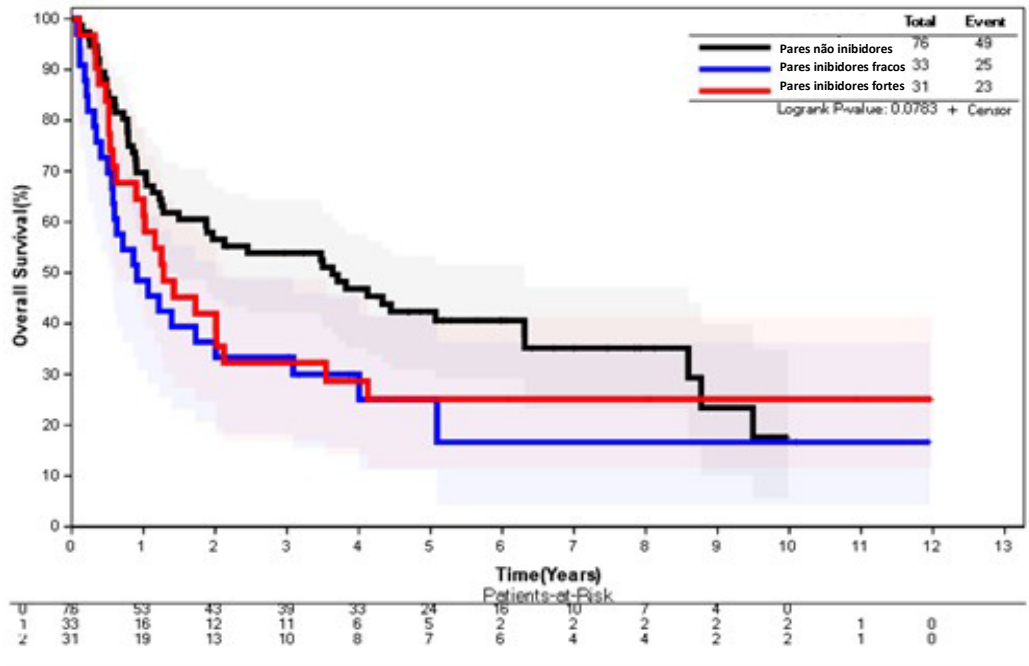
continua

conclusão

**Tabela 7 -** Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo mieloide

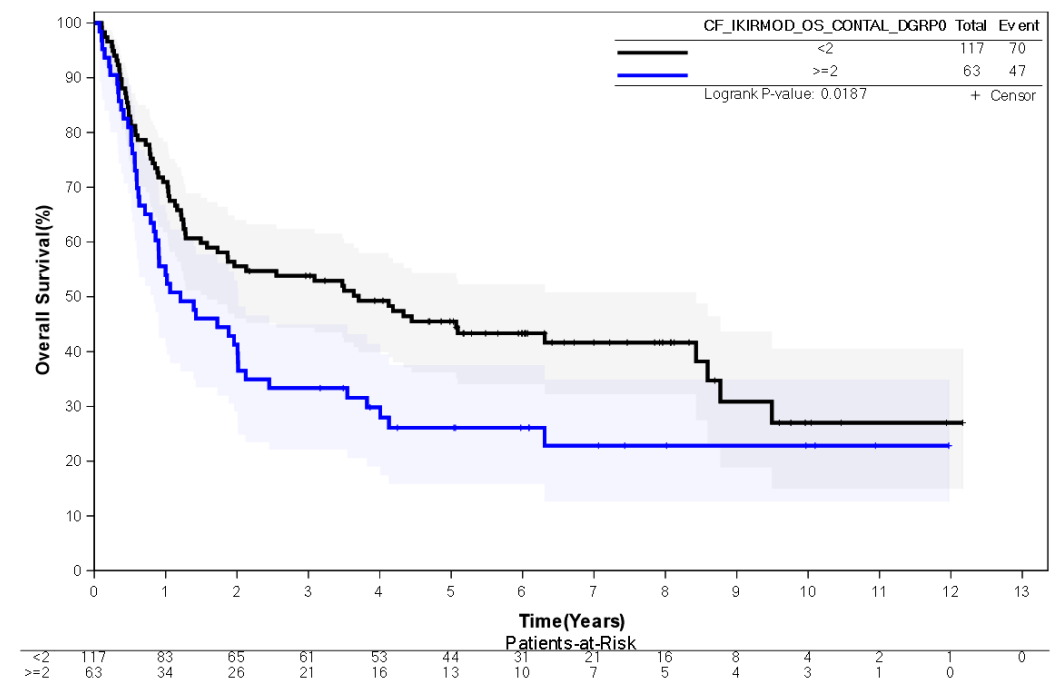
	N	RECAÍDA HR (IC 95%)	P	SG HR (IC 95%)	P	MNR HR (IC 95%)	P	DECHA HR (IC 95%)	P	DECHC HR (IC 95%)	P
<i>CF KIR SCORE</i>											
< 2.75	52	1		1		1		1		1	
≥ 2.75	128	0.97 (0.66-1.43)	0.69	1.32 (0.91-1.91)	0.29	1.48 (0.62-3.52)	0.37	1.01 (0.42-2.38)	0.99	0.77 (0.43-1.39)	0.39
<i>CF KIR SCORE MOD</i>											
< 2	117	1		1		1		1		1	
≥ 2	63	1.07 (0.72-1.58)	0.75	<b>1.56 (1.07-2.25)</b>	<b>0.02</b>	1.63 (0.68-3.92)	0.27	1.64 (0.71-3.77)	0.25	0.81 (0.45-1.45)	0.48

**Gráfico 21** - Sobrevida global de acordo com modelo KIR3DL1/Bw4. Linha preta par não inibitório, linha azul par inibitório fraco e linha vermelha par inibitório forte.



Fonte: Produção da autora (2023).

**Gráfico 22** - Sobrevida global de acordo com CF-KIR score modificado. Linha preta CF-KIR score modificado < 2 e linha azul ≥2.



Fonte: Produção da autora (2023).

**Tabela 8** - Análise regressão multivariada para o desfecho sobrevida global no subgrupo mieloide

	HR (IC 95%)	p-value
<b>Diagnóstico</b>		
SMD	1	
LMA	0,65 (0,45 – 0,94)	<b>0.02</b>
<b>Idade do paciente</b>		
< 65 anos	1	
≥ 65 anos	1,63 (1,12 – 2,35)	<b>0.01</b>
<b>CF-iKIR score modificado</b>		
< 2	1	
≥ 2	1,41 (0,97 – 2,05)	0.07

\*N = 180.

\*\**Backward selection* com nível alfa de 0.10. Variáveis removidas do modelo: Genotipo KIR centromérico, HCT-CI, KIR3DL1/Bw4.

#### 4.7.2 Subgrupo linfoide

Na análise no subgrupo linfoide, a presença de par inibitório forte do modelo KIR3DL1/Bw4 esteve associado a menor risco de recaída (HR, 0,53, IC95% (0,29-0,98, 0=0,04) (Tabela 9 e Gráfico 23). Porém, na análise multivariada, apenas o modelo *Missing ligand* apresentou associação significativa, com a presença de, pelo menos, um receptor inibitório KIR presente com o respectivo ligante faltante associada a maior risco de recaída (HR, 1,72 IC 95% 1,02-2,92, p=0.04).

Nenhum variável teve associação estatisticamente significativa com sobrevida global e DECHa grau II-IV. Mortalidade não relacionada à recaída foi maior nos pacientes acima de 57 anos (HR, 3,03 IC95% 1,13-8,18, p=0.028) e nos pares inibitórios fortes do modelo KIR3DL1/Bw4 (HR, 2,68 IC95% 1,0-7,17, p=0.49). Menor risco de DECH crônica foi encontrado em pacientes com HCT-CT>1 (HR, 0,53 IC95% 0,33-0,87,p=0,012), diagnóstico de Linfoma não Hodgkin (HR, 0,35 IC95% 0,19-0,65,p=0,001) e CF-iKIR score ≥3 (HR, 0,43 IC95% 0,19-0,98, p=0,044).

**Tabela 9 -** Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo linfoide

	N	RECAÍDA		SG		MNR		DECHA		DECHC	
		HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
<i>Receptor Ligante</i>											
No	133	1		1		1		1		1	
Yes	30	1.65 (0.98-2.81)	0.06	1.26 (0.68-2.31)	0.46	0.59 (0.17-1.98)	0.39	1.71 (0.68-4.30)	0.26	0.56 (0.27-1.20)	0.14
<i>Haplótipo telomérico</i>											
A/A	95	1		1		1		1		1	
B/x	64	0.87 (0.54-1.41)	0.58	0.95 (0.57-1.56)	0.83	0.93 (0.43-2.02)	0.85	1.22 (0.53-2.79)	0.64	0.69 (0.41-1.17)	0.17
<i>Haplótipo Centromérico</i>											
A/A	78	1		1		1		1		1	
B/x	85	1.20 (0.77-1.89)	0.42	0.64 (0.39-1.05)	0.08	0.79 (0.36-1.69)	0.54	1.69 (0.72-3.99)	0.23	0.76 (0.47-1.23)	0.27
<i>Genótipo Centromérico</i>											
A/A	78	1		1		1		1		1	
A/B	69	1.30 (0.82-2.08)	0.26	0.71 (0.43-1.18)	0.19	0.81 (0.37-1.81)	0.61	1.62 (0.66-3.99)	0.29	0.75 (0.45-1.25)	0.27
B/B	16	0.82 (0.34-1.96)	0.65	0.35 (0.11-1.14)	0.08	0.67 (0.14-3.20)	0.62	2.00 (0.52-7.69)	0.31	0.82 (0.34-1.99)	0.66
<i>KIR2DS1/HLA-C</i>											
KIR2DS1+/C1+	58	1		1		1		1		1	
Outros	105	1.26 (0.78-2.03)	0.35	0.97 (0.59-1.62)	0.92	1.05 (0.47-2.32)	0.91	0.80 (0.35-1.86)	0.61	3.04 (0.44-20.77)	0.258
<i>KIR3DL1/Bw4</i>											
Par não inibitório	59	1		1		1		1		1	
Par inibitório fraco	21	0.69 (0.38-1.27)	0.23	0.67 (0.29-1.54)	0.34	0.92 (0.18-4.72)	0.92	1.86 (0.55-6.35)	0.32	0.87 (0.37-2.04)	0.74
Par inibitório forte	42	<b>0.53 (0.29-0.98)</b>	<b>0.04</b>	1.02 (0.57-1.84)	0.95	2.61 (0.98-6.95)	0.05	0.94 (0.26-3.34)	0.92	1.33 (0.73-2.41)	0.35
<i>IM KIR SCORE</i>											
<5	102	1		1		1		1		1	
=5	61	1.12 (0.71-1.76)	0.63	0.96 (0.58-1.59)	0.88	1.08 (0.50-2.37)	0.84	1.44 (0.63-3.32)	0.39	0.92 (0.56-1.51)	0.73

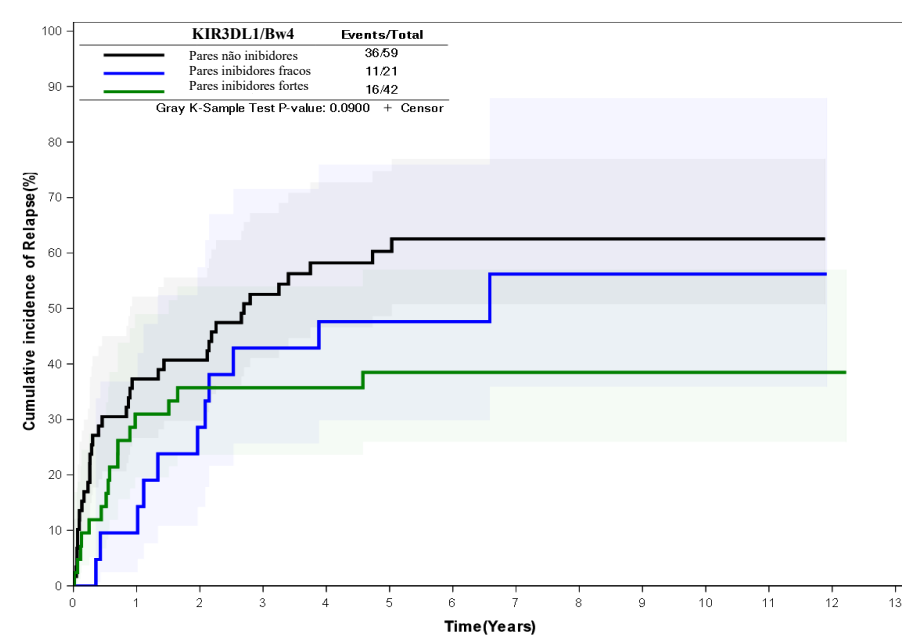
continua

conclusão

**Tabela 9** - Análise univariada com os modelos KIR no subgrupo linfoide

	N	RECAÍDA		SG		MNR		DECHA		DECHC	
		HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
<i>CF KIR SCORE</i>											
< 3.0	143	1		1		1		1		1	
>=3.0	20	1.12 (0.57-2.18)	0.74	1.39 (0.71-2.72)	0.34	1.84 (0.68-5.01)	0.23	1.71 (0.57-5.10)	0.34	0.48 (0.20-1.12)	0.09
<i>CF KIR SCORE MOD</i>											
<2	110	1		1		1		1		1	
>=2.5	53	1.11 (0.70-1.76)	0.65	1.26 (0.76-2.07)	0.37	1.51 (0.70-3.25)	0.29	0.78 (0.31-2.01)	0.61	0.87 (0.51-1.46)	0.59

**Gráfico 23** - Incidência acumulada de recaída no subgrupo linfóide de acordo com modelo KIR3DL1/Bw4. Linha preta par não inibitório, linha azul par inibitório fraco e linha verde par inibitório forte.



Fonte: Produção da autora (2023).

#### 4.8 IMPACTO CLÍNICO DA VARIAÇÃO ALÉLICA

Como os genes *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* e *KIR2DS1* apresentaram frequência e variedade alélica relevantes, uma análise exploratória da diferença alélica em relação ao risco de recaída foi realizada.

Em uma análise univariada, não houve diferença significativa entre os alelos mais frequentes de *KIR3DL1* e *KIR2DL3*. Embora também não estatisticamente significativa, o risco de recaída na presença do alelo *KIR2DL2\*001* quando comparado ao alelo *KIR2DL2\*003* apresentou HR 1,55 (IC 95% 0,95-2,53) e na presença do alelo *KIR2DS1\*002* em relação aos demais alelos *KIR2DS1* HR 1,36 (0,96-1,93).

No subgrupo de doenças mielóides, a presença do alelo *KIR2DL2\*001* em relação ao alelo *KIR2DL2\*003* esteve associado a maior risco de recaída (HR, 2,07 IC95% 1,02-4,18, p=0,04).

As diferenças alélicas estudadas não mostraram associação com sobrevida global.



## **5 DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

Esse estudo analisa a tipificação KIR por meio da técnica de sequenciamento de nova geração em doadores de células-tronco hematopoiéticas HLA compatíveis e avalia a associação dos diversos modelos KIR com os principais desfechos clínicos pós-TCTH alogênico. Trata-se do primeiro estudo com uma coorte de pacientes submetidos ao mesmo protocolo de transplante, com regime de condicionamento não mieloablativo e profilaxia de DECH com ciclosporina e micofenolato mofetila.

Apesar dos diversos avanços nos resultados do TCTH alogênicos nas últimas décadas, a recaída da doença neoplásica permanece como causa importante de mortalidade pós-transplante e esforços buscando maior controle da doença de base sem aumentar o risco de doença do enxerto contra o hospedeiro são importantes para melhora da sobrevivência dos pacientes<sup>45,121</sup>. Nesse contexto, a compreensão mais profunda da imunogenética das células NK pode permitir a incorporação de novos critérios na seleção de doador, um dos elementos de maior impacto nos desfechos pós-transplante, principalmente entre TCTH com doadores não aparentados.

Descrita inicialmente em 1997 de acordo com a presença/ausência de cada gene, a genotipagem KIR é complexa pelas características particulares dessa região, que apresenta importante variação estrutural, com inserções e deleções relativamente incomuns quando comparadas ao restante do genoma humano<sup>122</sup>. Por 20 anos, avanços progressivos das técnicas moleculares foram sendo realizados até que, em 2016, o primeiro método de sequenciamento de genes KIR utilizando *NGS*, técnica utilizada nesse estudo, foi desenvolvido<sup>100</sup>. Essa técnica de sequenciamento gera fragmentos curtos cuja interpretação só foi possível com o uso da *pipeline* de informática PING, capaz de converter os dados de fragmentos curtos do sequenciamento em genótipos KIR de alta resolução<sup>100,123</sup>.

A variabilidade dos genes KIR também é encontrada entre populações. Estudos de coortes com ascendência europeia encontraram uma frequência de haplótipos do grupo A centromérico e telomérico de 67% e 76%, respectivamente<sup>70,124</sup>, frequência superior à encontrada em nossa população. Embora os pacientes do nosso estudo fossem majoritariamente caucasianos (81,3%), quase 10% dos pacientes eram de origem asiática e apresentaram genótipos com uma maior proporção de haplótipos A (70%) comparada à frequência entre os caucasianos (51%). Estudos populacionais que descrevem os conteúdos dos haplótipos A e B mostram uma maior frequência do haplótipo A em populações asiáticas<sup>125,126</sup>. Estudo realizado

em uma coorte brasileira de ascendência japonesa na cidade de Curitiba encontrou uma frequência de 60,8% de indivíduos homozigotos A/A<sup>127</sup>.

A alta resolução caracterizada com 5 dígitos foi possível apenas em parte da nossa coorte, de modo que utilizamos os dados da avaliação gênica em 3 dígitos, denominada pela nomenclatura como nível intermediário. Tal resolução determina um grupo de proteínas codificadas pelo gene *KIR* que difere dos demais alelos por substituições de DNA não sinônimas. Estudos descrevendo o polimorfismo dos genes *KIR* em nível alélico são bastante escassos. Amorim e colaboradores publicaram, recentemente, o maior estudo de genótipo *KIR* em alta resolução (5 dígitos) numa coorte de 2.130 indivíduos norte-americanos saudáveis<sup>128</sup> e apenas dois estudos prévios apresentam dados *KIR* com resolução em 3 dígitos no contexto do TCTH<sup>110,129</sup> e são discutidos adiante.

Embora grande variação dentro dos haplótipos definidos pelo número de genes seja descrita na literatura, particularmente dentre os haplótipos B, a maior coorte publicada encontrou que 94% da diversidade é marcada pelo conteúdo gênico de 3 haplótipos na região centromérica (*cA01*, *cB02*, *cB01*) e 92% dos haplótipos teloméricos são *tA01* e *tB01*. Esses haplótipos também foram os mais frequentes na nossa população e utilizados como referência para a classificação dos haplótipos complexos. A frequência dos alelos mais comuns do nosso estudo também foi semelhante ao descrito na literatura assim como a identificação de novos possíveis alelos em todos os *loci*, à exceção de *KIR3DL1S1*.

Similar aos avanços metodológicos da genotipagem *KIR*, o estudo e a compreensão da atividade das células NK mediada pelos receptores *KIR* pós-TCTH têm sido foco de estudo de alguns grupos de pesquisa e diversos modelos de interação dos receptores com seus respectivos ligantes foram descritos nas últimas décadas, com resultados controversos sobre o impacto em desfechos clínicos pós-transplante, principalmente recaída (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 10** - Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos KIR ligante-ligante e receptor ligante em desfechos no TCTH alogênico

Referências	N	Diagnóstico	Doador	Enxerto	Desfechos clínicos
<b>Modelo KIR ligante-ligante (TCTH com incompatibilidade HLA)</b>					
Ruggeri e cols. <sup>86</sup>	92	LMA/LLA	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: maior SLP, SG, menor recaída (LMA)
Ruggeri e cols. <sup>86</sup>	92	LMA/LLA	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: maior SLP, SG, menor recaída (LMA)
Davies e cols. <sup>130</sup>	175	Misto	NAP	TCDex/TCR	KIR ligand mismatch: pior SG (coorte mieloide)
Giebel e cols. <sup>131</sup>	130	Misto	NAP	TCDin	KIR ligand mismatch: maior SLD, menor MNR
Schaffer e cols. <sup>132</sup>	190	Misto	NAP	TCDin e ex	KIR ligand mismatch: maior MNR e menor SG
Elmaagacli e cols. <sup>133</sup>	236	LMC/SMD	NAP	TCR	KIR ligand mismatch: menor recaída molecular
Yabe e cols. <sup>134</sup>	1489	Misto	NAP	TCDin/TCR	KIR ligand mismatch: aumento DECHa e menor SG (HLA C mismatch)
Ruggeri e cols. <sup>85</sup>	116	Misto	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: Menor recaída, maior SLE, menor risco de recaída ou morte
Huang e cols. <sup>135</sup>	116	Misto	Haplo	TCDin	KIR ligand mismatch: maior DECHa II-IV e recaída, menor SG.
Mancusi e cols. <sup>136</sup>	161	LMA/LLA	Haplo	TCDex	Doadores NK alorreativos: menor recaída e maior SLE (LMA)
Yahng e cols. <sup>137</sup>	100	LMA	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: maior recaída e reativação CMV, menor SLD
Zhao e cols. <sup>138</sup>	180	Misto	Haplo	TCDex	KIR ligand match: menor reativação CMV, maior expressão de IFN- $\gamma$
Wanquet e cols. <sup>139</sup>	144	Misto	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: menor recaída e maior SLP
Shimoni e cols. <sup>140</sup>	444	LMA/LLA	Haplo	TCDex	KIR ligand mismatch: tendência a maior recaída, menor SG (LMA)
<b>Modelo Receptor Ligante (Missing ligand)</b>					
Leung e cols. <sup>141</sup>	36	Misto	Haplo	TCDex	Menor recaída
Cook e cols. <sup>142</sup>	220	Misto	AP	-	HLA C2C2 vs. HLA C1/x pacientes menor SG
Hsu e cols. <sup>89</sup>	1770	Misto	NAP	TCR	Menor recaída em HLA mismatch TCTH
Ludajic e cols. <sup>143</sup>	124	Misto	NAP	TCR/TCDin	Missing ligand para doador KIR2DL1: maior DECHa
Linn e cols. <sup>144</sup>	151	Misto	AP	TCR	Sem impacto
Gagne e cols. <sup>145</sup>	264	Misto	NAP	TCR	Ausência HLA C1: menor SG
Clausen e cols. <sup>146</sup>	100	Misto	AP	TCR	Pacientes com HLA C1C2: menor recaída e DECHa
Bjorklund e cols. <sup>147</sup>	105	LMA/SMD	AP	TCR/TCDin	Sem impacto

continua

conclusão

**Tabela 10** - Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos KIR ligante-ligante e receptor ligante em desfechos no TCTH alogênico

Referências	N	Diagnóstico	Doador	Enxerto	Desfechos clínicos
<i>Modelo Receptor Ligante</i>					
Wu e cols. <sup>148</sup>	116	Misto	NAP	TCR/TCDin	iKIR: menor recaída, maior SG e SLD (coorte mieloide)
Zhou e cols. <sup>149</sup>	219	Misto	AP	-	HLA C1C1 menor DECHa
Sobecks e cols. <sup>150</sup>	909	LMA/SMD	NAP	TCR/TCDin	iKIR: maior DECHa e MNR
Faridi e cols. <sup>151</sup>	281	Misto	AP/NAP	TCDin	iKIR: menor recaída e melhor SLP
Neuchel e cols. <sup>152</sup>	1446	Misto	NAP	TCR	HLA C2C2 menor SG e maior recaída
Arima e cols. <sup>153</sup>	10638	Misto	AP/NAP	TCD/TCR	HLA C1C1 menor recaída e maior SLP (LMA e LMC)
Arima e cols. <sup>154</sup>	2884	LLA	AP/NAP	TCD	HLA C1C1 maior recaída

Fonte: Modificada de Gao e cols (2020)<sup>175</sup>.

**Tabela 11** - Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos baseados na genotipagem KIR em desfechos no TCTH alogênico

Referências	N	Diagnóstico	Doador	Enxerto	Desfechos clínicos
<i>Modelo haplótipo KIR e genes</i>					
Cooley e cols. <sup>155</sup>	448	LMA	NAP	TCR	Doador KIR B/x: maior recaída e DECHc
Cook e cols. <sup>142</sup>	220	Misto	AP	-	KIR2DS2: menor SG em pacientes HLA C2C2 em doenças mieloides
Chen e cols. <sup>156</sup>	131	Misto	AP	TCDex/ TCR	KIR2DS2: maior reativação CMV pacientes HLA C2C2. Presença de outros genes KIR ativadores: maior SG e menor reativação CMV
Yabe e cols. <sup>134</sup>	1489	Misto	NAP	TCDin/TCR	KIR2DS2: aumento DECHa (HLA C incompatível)
Ludajic e cols. <sup>143</sup>	124	Misto	NAP	TCDin/TCR	KIR2DS2: menor DECHa (HLAC1C2)
Zaia e cols. <sup>157</sup>	211	Misto	AP/NAP	TCR	Presença KIR2DS2 e KIR2DS4: menor reativação de CMV. Conteúdo B $\geq$ 5: menor reativação CMV.
Venstrom e cols. <sup>158</sup>	1087	Misto	NAP	TCDex/ TCR	KIR3DS1: menor DECHa. Em leucemia aguda e LMC, menor MRT e mortalidade
Wu e cols. <sup>148</sup>	116	Misto	NAP	TCDin/ TCR	KIR2DS3: aumento recaída e menor SG em doenças mieloides. Maior número de genes ativadores: aumento recaída.
Tomblyn e cols. <sup>159</sup>	116	Misto	NAP	TCDex/TCR	Doador B/x: redução de infecções até D+180
Cooley e cols. <sup>80</sup>	1409	LMA/LLA	NAP	TCR	Redução recaída em pacientes com LMA para doadores KIR B/x, Cen BB vs. outros, Tel B vs. Tel AA, conteúdo B $\geq$ 2.
Venstrom e cols. <sup>56</sup>	1277	LMA	NAP	TCDex/TCR	Doador com KIR2DS1 e HLA C1 no paciente menor recaída
Zhou e cols. <sup>149</sup>	219	Misto	AP	-	HLA C1C1 menor DECHa
Impola e cols. <sup>160</sup>	134	Misto	AP	-	KIR2DL2 ou KIR2DS2 melhor SLP em LMA
Bao e cols. <sup>161</sup>	210	Misto	NAP	TCDin	Doador KIR B/x: melhor SG, SLP, menor recaída (LMA e SMD)
Bachanova e cols. <sup>162</sup>	614	LNH	NAP	TCDin	Doador KIR B/x: redução de recaída e melhor SLP
Kamenaric e cols. <sup>163</sup>	111	Misto	AP/NAP	TCDin	KIR2DS4 – sem impacto em DECH
Hosokai e cols. <sup>164</sup>	106	Misto	AP/NAP	TCR	Doador KIR B/x: maior DECHa principalmente em HLA mismatch TCTH

continua

conclusão

**Tabela 11** - Principais estudos (N>100) que avaliaram os modelos baseados na genotipagem KIR em desfechos no TCTH alogênico

Referências	N	Diagnóstico	Doador	Enxerto	Desfechos clínicos
<i>Modelo haplótipo KIR e genes</i>					
Neuchel e cols. <sup>152</sup>	1446	Misto	NAP	TCR	KIR2DS2: maior SG e SLD (HLA C2C2). KIR2DS1: menor recaída e maior MRT. KIR2DS5 (menor recaída)
Heatley e cols. <sup>165</sup>	152	Misto	AP	TCR	Em LMA, KIR2DS2: maior SG. Cen B/x maior SG e menor DECHa. Tel-B/x menor reativação CMV
Tordai e cols. <sup>166</sup>	314	Misto	AP/NAP	-	KIR2DS1 e HLA C2: maior SG
Nakamura e cols. <sup>167</sup>	288	LMA	AP/NAP	TCD	Doador KIR B/x: menor recaída e maior MNR em pacientes com reativação CMV
Bultitude e cols. <sup>168</sup>	119	LMA	NAP	TCD/TCR	Doador Cen B/x: menor SG e MNR
Weisdorf e cols. <sup>90</sup>	2662	LMA	NAP	TCDin/TCR	Doador KIR B/x: menor recaída e maior SLP
Boudreau e cols. <sup>84</sup>	1328	LMA	NAP	TCR/TCD	KIR3DL1-Bw4 não inibitório ou inibitório fraco menor recaída e mortalidade
Schetelig e cols. <sup>94</sup>	2222	LMA/SMD	NAP	TCDex/TCR	Modelos KIR3DL1/KIR2DS1 sem impacto.
Guethlein e cols. <sup>110</sup>	890	LMA	NAP	TCR/TCDin	Tendência menor recaída em pacientes <i>CenB02 vs. CenB01</i>
Shaffer e cols. <sup>169</sup>	394	LMA/SMD	NAP	TCR/TCDex	KIR3DL1/Bw4 inibitório fraco maior risco de recaída e SLE
<i>Modelos combinados</i>					
Krieger e cols. <sup>98</sup>	2365	LMA	NAP	TCR/TCDex	Conteúdo KIR inibitório menor risco de recaída e maior MRT
Schetelig e cols. <sup>96</sup>	1836	LMA/SMD	NAP	TCD/TCR	Sem impacto nos desfechos clínicos

Fonte: Modificada de Gao e cols (2020)<sup>175</sup>.

Nesse estudo, não encontramos associação do genótipo KIR com o desfecho primário recaída, tanto quando avaliada a região telomérica como, a centromérica. Estudos iniciais desse modelo mostraram redução do risco de recaída em pacientes submetidos a TCTH por LMA com doadores não aparentados com haplótipo centromérico B, tanto em regimes de condicionamento mieloablativo quanto de intensidade reduzida<sup>80,90,155</sup>. Nessa teoria, hipotetiza-se que o número de receptores ativadores encontrada no haplótipo B, principalmente na região centromérica (genes *KIR2DS2* e *KIR2DS35*) e descrito como conteúdo B, fosse responsável por aumentar o efeito de alorreatividade, impactando na indução de GVL e controle de recaída<sup>155</sup>. Assim como os dados aqui apresentados, outros grupos independentes também não encontraram associação desse modelo com melhores desfechos<sup>96,170</sup>. Embora tenha sido possível classificar o haplótipo B centromérico em *B01* e *B02*, a correlação desses haplótipos com os desfechos clínicos ficou prejudicada pelo número limitado de doadores na nossa coorte com os genótipos *B01/B01*, *B01/B02* e *B02/B02*. Estudo recente usando a tipificação KIR por NGS em parte da coorte original de pacientes com LMA das publicações iniciais desse modelo (CIBMTR), mostrou tendência na redução da incidência acumulada de recaída em doadores com haplótipo *Cen B02*<sup>110</sup>. Dados desse estudo sugerem que a presença de dois segmentos B, principalmente *Cen B*, estariam associados à maior proteção para recaída e que, portanto, os genes *KIR2DL2* e/ou *KIR2DS2* seriam necessários. Numa análise exploratória devido ao número limitado de pacientes, encontramos uma associação entre os alelos *KIR2DL2* e o risco de recaída no grupo de pacientes com doenças mieloides. Tal achado se correlaciona com o fato de que os alelos comparados, *KIR2DL2\*001* e *KIR2DL2\*003*, são marcadores dos haplótipos centroméricos *B01* e *B02*, respectivamente; de modo que o achado sugere uma associação com menor de recaída para pacientes transplantados com doadores com haplótipos *B02* assim como sugerido por Guethlein e colaboradores. Outros autores avaliaram as diferenças alélicas dos genes *KIR2DL1/2/3* por análise fenotípica e funcional, e encontraram que células NK *KIR2DL2\*001+* apresentaram a pior degranulação entre os alelos *KIR2DL2/3*, e estavam mais associadas ao genótipo *CenAB* enquanto *KIR2DL2\*003* foi observado, principalmente, em indivíduos *CenBB* sem *KIR2DL3*. Embora limitado pelo pequeno número de indivíduos, esse grupo, posteriormente, aplicou os achados numa coorte de transplantes haploidênticos com ciclofosfamida pós-transplante e encontrou uma menor incidência de recaída nos indivíduos com doença mielóide transplantados com doadores *CenAA*, achado associado à capacidade de degranulação do alelo *KIR3DL1\*003*<sup>129</sup>. Diferenças entre os alelos mais frequentes de *KIR2DL3* não foram encontradas assim como na nossa coorte. Similarmente, não foi possível avaliar a associação com *KIR2DS2* devido ao padrão



monomórfico (*KIR2DS2\*001* em 93%). Os dados da literatura para o gene *KIR2DS35*, não avaliável em nosso estudo, também mostram um padrão monomórfico, com 3 alelos com frequência maior que 1% descritos em coorte norte-americana: *KIR2DS5\*00201*, *KIR2DS3\*00103* e *KIR2DS3\*00201*. A limitada variação alélica dos genes dos receptores ativadores pode explicar uma possível maior relevância dos genes inibidores KIR na indução de alorreatividade NK pós-TCTH.

O sequenciamento dos genes KIR permite a obtenção do número de cópias de cada gene, o que não é levado em consideração por nenhum dos modelos de alorreatividade de células NK previamente descritos. Estudos anteriores mostraram que o número de cópias correlaciona-se com a frequência das células NK expressando tal receptor e não com o nível de expressão dos receptores em cada célula NK<sup>171,172</sup>. Nosso estudo não identificou associação do número de cópias com o desfecho recaída, dado não avaliado por nenhum outro estudo no contexto de TCTH.

Os modelos KIR que analisam interações individuais entre a presença do gene KIR e seu respectivo ligante HLA de classe I encontraram nos estudos pivotais correlação significativa, mas também não foram replicados por outros grupos. O modelo com o gene ativador *KIR2DS1* e HLA C1 mostrou tanto a importância da presença do gene no doador quanto a força do impacto em recaída pós-transplante quando a presença do gene é concomitante à presença do ligante HLA C1<sup>56</sup>. Estudos experimentais prévios dão suporte ao modelo mostrando citotoxicidade de clones de células NK *KIR2DS1* positivas quando doador também apresentava HLA C1, ao contrário do doadores com HLA-C2/C2. Assim como no nosso estudo, outras coortes com maior número de pacientes e limitadas à leucemia mieloide aguda não mostraram vantagem desse modelo, sendo questionado o quanto a variabilidade das características clínicas dos transplantes de cada coorte, como regime de condicionamento, profilaxia de DECH e doença de base, poderia impactar na avaliação do modelo<sup>94,96</sup>.

O modelo KIR3DL1/Bw4 incorpora o refinamento da tipificação em alta resolução dos alelos de *KIR3DL1* a partir da análise experimental da interação dos alelos com os respectivos ligantes<sup>84</sup>. Esse estudo reforça a teoria de que a distinção dos alelos KIR é informativa, e trará contribuições relevantes para o melhor entendimento da função das células NK no controle da doença neoplásica por meio do GVL pós-transplante. Nesse modelo, os alelos foram classificados de acordo com sua expressão e interação com o receptor Bw4 (80T/80I). A partir dessa análise, os pares doador-receptor inibitórios fortes estariam associados a maior risco de recaída em relação aos pares não inibitórios e inibitórios fracos, assim como, menor sobrevida global em pacientes com LMA. No nosso trabalho, esse modelo esteve associado em análise

univariada com sobrevida global, mostrando benefício do par sem interação inibitória no grupo de doenças mieloides quando comparado aos pares inibidores fracos e fortes. Trabalho subsequente do grupo num cenário de avaliação prospectiva teve achado diferente, com o par inibitório fraco sendo superior em prevenção de recaída e aumento de sobrevida global em relação aos outros dois<sup>169</sup>. Pode-se considerar que o par não inibitório é um exemplo do modelo receptor-ligante, com células NK não educadas e potencialmente hiporresponsivas. O par inibitório fraco conferiria responsividade NK por meio do processo de educação e, embora a inibição *in vivo* seja fraca, sua resposta teria efeito no controle de doença. Entretanto, existe evidência de aumento de responsividade de células NK não educadas em condições altamente inflamatórias<sup>60</sup>, que, no contexto do transplante, podem ser responsáveis pela modulação dessa resposta. Diferente da maioria das coortes de registro estudadas, nossa população foi submetida a um transplante não mieloablativo com depleção *in vivo* de célula T (ATG) e irradiação linfóide total. Tanto a intensidade do regime de condicionamento quanto o uso de ATG influencia a reconstituição imune pós-transplante. Estudos mostram que o uso de ATG retarda a recuperação de células T e aumentam as células NK, principalmente as CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, mais imatura e com maior capacidade citolítica e menor proliferação<sup>173-175</sup>.

Outros dois dados interessantes trazidos por esse modelo podem ser considerados. Primeiro, os dados do modelo KIR3DL1/Bw4 foram avaliados numa análise subsequente em associação com o modelo KIR2DS1/HLA-C. Doadores de pares não inibitórios ou inibitórios fracos e KIR2DS1/HLA-C1 apresentavam o menor risco de recaída na mesma coorte de pacientes submetidos a TCTH alogênico por LMA. Tal análise corrobora as avaliações mais recentes que levam em consideração as múltiplas interações possíveis do repertório de receptores KIR das células NK.

Outro dado interessante, abordado na avaliação prospectiva citada anteriormente, avalia prospectivamente o modelo KIR3DL1/Bw4 associado aos outros dois KIR2DS1/HLA-C e haplótipo B centromérico na busca de doadores não aparentados para LMA<sup>169</sup>. Nesse estudo, a tipificação KIR foi realizada pela técnica SSP e a determinação alélica por PCRs específicos publicados pelo grupo e aplicados em técnicas de sequenciamento<sup>70,176</sup>. O resultado era liberado em 72 horas a partir da chegada da amostra no laboratório, e os doadores eram ranqueados de acordo com a combinação dos modelos, priorizando KIR3DL1/Bw4. As opções de doadores não aparentados eram fornecidas aos centros para seleção em tempo real e não houve impacto no tempo da busca, mostrando a viabilidade de incorporação desse critério na busca de doadores não aparentados, em que 75% dos pacientes tiveram, pelo menos, um doador com vantagem KIR identificado.

Outro estudo avaliou a viabilidade da tipificação KIR na busca prospectiva de doadores não aparentados aplicando o modelo haplótipo B centromérico<sup>177</sup>. A tipificação foi realizada em dois laboratórios, um clínico e outro de pesquisa, por meio de kit de genotipagem KIR para *loci* específicos. O tempo mediano entre a chegada da amostra no laboratório inicial e a entrega dos resultados ao centro de transplante foi maior que no estudo anterior, mas mais compatível com uma implantação na prática clínica (14 dias, variando entre 8 e 26 dias)<sup>169,177</sup>. Não houve diferença no tempo entre a busca e o transplante para os pacientes que tiveram a genotipagem KIR incorporada em relação aos que não tiveram. Em ambos os cenários de avaliação prospectiva, a tipificação KIR foi limitada seja a um único gene em alta resolução seja a um grupo limitado de genes baseado na presença/ausência. Esforços colaborativos para que as técnicas de sequenciamento que permitem a tipificação completa e em alta resolução do genótipo KIR têm sido feitos, mas ainda não é uma realidade transladada<sup>178</sup>.

A investigação das interações KIR-HLA de forma combinada, considerando todos os receptores potencialmente presentes nas células NK tem base lógica forte, porém só foi considerada em publicações mais recentes. Um primeiro modelo, dentro do contexto de controle de infecções virais, avaliou a combinação das interações funcionais dos receptores inibitórios e mostrou correlação com o risco de progressão de infecções por HIV, VHC e HTLV-1, e maior sobrevida das células T CD8<sup>+</sup><sup>95</sup>. Estudos aplicando o CF-iKIR *score* no contexto do transplante mostrou associação com redução do risco de recaída e maior SLP (CF-iKIR *score* >1) em transplantes com doadores não relacionados para LMA e SMD, e em doadores haploidênticos (CF-iKIR *score* >2) com maior sobrevida global e sobrevida livre de progressão<sup>96,179</sup>. Nosso estudo não mostrou benefício desse *score* tanto na coorte total assim como nos subgrupos de doenças. O racional para explicar a potencial vantagem de um maior repertório de receptores inibidores no contexto do transplante alogênico seria uma célula NK mais educada, mas que necessitaria da regulação negativa (*down regulation*) das moléculas HLA de classe I, evento frequente em células neoplásicas, porém não no contexto pós-TCTH alogênico, no qual a hipoexpressão das moléculas HLA de classe II aparece como principal mecanismo de escape imunológico<sup>53,180</sup>. Outro possível mecanismo seria o impacto da presença dos receptores KIR inibitórios na atividade e sobrevida das células T<sup>181,182</sup>.

Embora inicialmente atraente, o agrupamento das interações KIR-HLA também pode ser considerado simplista e não considera as potenciais diferenças qualitativas entre os alelos KIR e HLA, por exemplo. Nosso estudo incorpora as diferenças alélicas do gene *KIR3DL1* mais bem consolidadas com estudos experimentais e clínicos ao *score*, e encontra uma associação contrária ao reportado até então, uma menor sobrevida global para os pacientes com

doença mieloide com CF-iKIR *score* modificado  $\geq 2$ , achado que aparece sugestivo de relevância na análise multivariada. Embora não estatisticamente significativo individualmente, o achado de pior sobrevida global pode ser explicado pela combinação de maior incidência de recaída, mortalidade não relacionada ao transplante e DECH aguda nesse grupo. O modelo KIR3DL1/Bw4, isoladamente, identificou risco de menor sobrevida global nos pacientes com pares inibitórios desse subgrupo de pacientes, principalmente o inibitório fraco. A incorporação da avaliação dos outros receptores inibidores parece ter amplificado o sinal do benefício do par não inibitório, e pode ser ainda mais refinada se compreendermos melhor as diferentes interações entre os alelos *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, e seus respectivos ligantes.

Nosso estudo mostra achados distintos de acordo com o subgrupo de doenças, mieloide e linfóide. Majoritariamente, os modelos KIR foram estudados em leucemia mieloide aguda. As doenças linfóides foram especificamente avaliadas em duas publicações em coortes de pacientes com LLC e LNH<sup>183,184</sup>. Embora estudos fora do cenário do transplante tenham sugerido impacto das interações KIR/HLA em SLP e recaída, estudo publicado posteriormente ao desenho desse trabalho em 573 adultos submetidos a transplante por LLC não encontrou associação com nenhum modelo KIR avaliado, indicando que a alorreatividade NK pode ser fraca e, nesse contexto, outros fatores clínicos exerçam mais impacto no controle de doença<sup>185</sup>. Em pacientes com LNH, doadores com genótipo *KIR B/x* estiveram associados à menor taxa de recaída e maior sobrevida global<sup>162</sup>. Outros modelos KIR não foram avaliados numa coorte isolada de pacientes com linfoma. No nosso estudo, o modelo receptor ligante esteve associado com risco de recaída pós-transplante. Entretanto, a presença de, pelo menos, um receptor KIR sem o respectivo ligante HLA esteve associada a maior risco de recaída, oposto do benefício proposto por esse modelo<sup>141</sup>. Nessa mesma direção, os pares inibitórios fortes do modelo KIR3DL1/Bw4 estiveram associados à proteção para o risco de recaída na análise univariada. A avaliação dos modelos em doenças linfóides específicas teria poder reduzido devido ao número limitado de pacientes e não foi realizada em nosso estudo. A caracterização do impacto da alorreatividade NK dentre as doenças linfóides, particularmente a compreensão no impacto do modelo do haplótipo KIR B em TCTH para linfoma não Hodgkin, necessita de coortes maiores e uma abrangente avaliação dos modelos, o que será dificultada pelas outras terapias emergentes para essas doenças, tornando o TCTH alogênico uma opção tardia para esses pacientes.

O impacto da alorreatividade NK em outros desfechos clínicos pós-transplante como infecções e DECH também foram exploradas em diversos estudos. Teoricamente, as células NK são capazes de induzir o efeito GVL sem indução de DECH, e isso foi particularmente

visto em estudos utilizando infusão de células NK de doadores, porém os dados com células NK reconstituídas pós-transplante são controversos<sup>130,131,155,164</sup>, e sugerem um menor efeito protetor de DECH nesse cenário, que também poderia ser parcialmente explicado pelas características das células NK nessa fase e a alorreatividade T presente<sup>175,186</sup>.

Esse estudo apresenta limitações importantes. Uma coorte de pacientes submetidos aos mesmo protocolo de transplante foi analisada, o que pode ter reduzido, em parte, a limitação imposta pelo número de pares doadores-receptores, porém também restringe a generalização dos achados para outros protocolos de transplante. Reativação de CMV, identificada em alguns estudos por influenciar o risco de recaída e influenciar a maturação das células NK, foi um dado não avaliado na nossa análise. Não foi possível caracterizar a compatibilidade HLA-DPB1 na maioria dos pares avaliados, de modo que essa variável não foi incluída nos modelos multivariados.

A determinação dos alelos foi limitada por falhas de reação que não puderam ser repetidas e que impossibilitaram uma avaliação mais detalhada da associação das variações alélicas com os desfechos clínicos e os demais modelos KIR.

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

Nesse estudo com pacientes submetidos a TCTH alogênico HLA-compatível com o regime de condicionamento não mieloablativo TLI-ATG, a alorreatividade NK pós-TCTH alogênico avaliada pelos modelos de interação KIR/HLA não teve associação com desfechos clínicos pós transplante, e apresentou resultados distintos para doenças mieloides e linfoides.

O modelo combinado de interação KIR com a incorporação do modelo KIR3DL1/Bw4 (CF iKIR *score* modificado) com elevada interação inibitória apresentou uma tendência de associação com menor sobrevida global nos pacientes com doença mieloide. A variação alélica do gene *KIR2DL2* mostrou associação entre o alelo *KIR2DL2\*001* e o risco de recaída em comparação a presença do alelo *KIR2DL2\*003*.

Nas doenças linfoides, a presença de uma incompatibilidade entre o receptor KIR inibitório e seu respectivo ligante (modelo receptor ligante) foi associada a maior risco de recaída da doença de base após o transplante.

Até o momento, nenhum modelo KIR apresentou dados consistentes para incorporação nos algoritmos de seleção de doador. A aplicação da metodologia NGS para genotipagem KIR pode ser útil para seleção de doador no TCTH alogênico mas avanços para simplificação da técnica e a identificação de um modelo acurado e consistente de acordo com o cenário do transplante e da doença de base ainda são necessários.

*Scores* combinados avaliando variações alélicas dos genes KIR inibitórios usando NGS devem ser alvo de avaliações em coortes de registros e aparecem como o modelo mais promissor.

## **REFERÊNCIAS**

---



## REFERÊNCIAS

1. Pessoa F. Livro Do Desassossego. (Brasiliense, ed.). São Paulo; 2003.
2. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813-26. doi: 10.1056/NEJMra052638.
3. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica*. 2020 Dec 1;105(12):2716-29. doi: 10.3324/haematol.2019.245688.
4. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethabd WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*. 1950 May;35(5):746-70. doi:10.5555/uri:pii:0022214350900357
5. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951;12(1):197-201. doi:10.1093/jnci/12.1.197
6. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*. 1970;9(6):571-87. doi:10.1097/00007890-197006000-00006
7. Thomas ED. Transplante de medula ossea: uma revisão histórica. *Medicina (Ribeirao Preto Online)*. 2000;33(3):209. doi:10.11606/issn.2176-7262.v33i3p209-218
8. Dausset J. Iso-leuco-anticorps [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol*. 1958 Jul-Oct;20(1-4):156-66. French. doi: 10.1159/000205478.
9. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. 1958 Jun 21;181(4625):1735-6. doi: 10.1038/1811735a0.
10. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. 1968 Dec 28;2(7583):1364-6. doi: 10.1016/s0140-6736(68)92672-x.
11. Phelan R, Aurora M, Chen M. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2020. *CIBMTR Newsl*. 2020;13(2):5-9.
12. Chiad Z, Chojecki A. Graft versus Leukemia in 2023. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2023 Sep;36(3):101476. doi: 10.1016/j.beha.2023.101476.
13. Morishima S, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Yabe T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Shiina T, Satake M, Saji H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA alleles for severe acute graft-versus-host disease and mortality in unrelated donor bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2016 Apr;101(4):491-8. doi: 10.3324/haematol.2015.136903.
14. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 May;18(5):325-339. doi: 10.1038/nri.2017.143.

15. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000 Sep 7;343(10):702-9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.
16. Nel AE. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 May;109(5):758-70. doi: 10.1067/mai.2002.124259.
17. Ottinger HD, Ferencik S, Beelen DW, Lindemann M, Peceny R, Elmaagacli AH, Husing J, Grosse-Wilde H. Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):1131-7. doi: 10.1182/blood-2002-09-2866.
18. Verneris MR, Lee SJ, Ahn KW, Wang HL, Battiwalla M, Inamoto Y, Fernandez-Vina MA, Gajewski J, Pidala J, Munker R, Aljurf M, Saber W, Spellman S, Koreth J. HLA mismatch is associated with worse outcomes after unrelated donor reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation: an analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Oct;21(10):1783-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.028.
19. Howard CA, Fernandez-Vina MA, Appelbaum FR, Confer DL, Devine SM, Horowitz MM, Mendizabal A, Laport GG, Pasquini MC, Spellman SR. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):4-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.017.
20. Fernández-Viña MA, Klein JP, Haagenson M, Spellman SR, Anasetti C, Noreen H, Baxter-Lowe LA, Cano P, Flomenberg N, Confer DL, Horowitz MM, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Setterholm M, Champlin R, Lee SJ, de Lima M. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013 May 30;121(22):4603-10. doi: 10.1182/blood-2013-02-481945.
21. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, Spellman S, Velardi A, Zino E, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2012 Apr;13(4):366-74. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9.
22. Lorentino F, Labopin M, Fleischhauer K, Ciceri F, Mueller CR, Ruggeri A, Shimoni A, Bornhäuser M, Bacigalupo A, Gülbas Z, Koc Y, Arcese W, Bruno B, Tischer J, Blaise D, Messina G, Beelen DW, Nagler A, Mohty M. The impact of HLA matching on outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT is modulated by GVHD prophylaxis. *Blood Adv.* 2017 Apr 21;1(11):669-80. doi: 10.1182/bloodadvances.2017006429.

23. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, Kowalski J, Tsai HL, Bolaños-Meade J, Morris LE, Crilley PA, O'Donnell PV, Rossiter N, Huff CA, Brodsky RA, Matsui WH, Swinnen LJ, Borrello I, Powell JD, Ambinder RF, Jones RJ, Fuchs EJ. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Apr;16(4):482-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.11.011.
24. Fuchs EJ, McCurdy SR, Solomon SR, Wang T, Herr MR, Modi D, Grunwald MR, Nishihori T, Kuxhausen M, Fingerson S, McKallor C, Bashey A, Kasamon YL, Bolon YT, Saad A, McGuirk J, Paczesny S, Gadalla SM, Marsh SGE, Shaw BE, Spellman SR, Lee SJ, Petersdorf EW. HLA informs risk predictions after haploidentical stem cell transplantation with posttransplantation cyclophosphamide. *Blood.* 2022 Mar 10;139(10):1452-1468. doi: 10.1182/blood.2021013443.
25. Suzuki S, Morishima S, Murata M, Tanaka M. Sequence variations within HLA-G and HLA-F genomic segments at the human leukocyte antigen telomeric end associated with acute graft-versus-host disease in unrelated bone marrow Transplantation. *Front Immunol.* 2022;13(July):1-12. doi:10.3389/fimmu.2022.938206.
26. Fuerst D, Neuchel C, Niederwieser D, Bunjes D, Gramatzki M, Wagner E, Wulf G, Glass B, Pfreundschuh M, Einsele H, Arnold R, Stuhler G, Schaefer-Eckart K, Freitag S, Casper J, Kaufmann M, Wattad M, Hertenstein B, Klein S, Ringhoffer M, Mytilineos D, Tsamadou C, Mueller C, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2016 Dec 29;128(26):3169-76. doi: 10.1182/blood-2016-05-716357.
27. Wieten L, Mahaweni NM, Voorter CE, Bos GM, Tilanus MG. Clinical and immunological significance of HLA-E in stem cell transplantation and cancer. *Tissue Antigens.* 2014 Dec;84(6):523-35. doi: 10.1111/tan.12478.
28. Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol.* 2003 Oct;31(10):844-54. doi: 10.1016/s0301-472x(03)00229-7.
29. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralto S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowsky R, Horowitz M. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec;15(12):1628-33. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.07.004.
30. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood.* 2014 Jul 17;124(3):344-53. doi: 10.1182/blood-2014-02-514778.
31. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, Laport GG, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Hoppe RT, Bloch DA, Blume KG, Negrin RS, Strober S. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 2005 Sep 29;353(13):1321-31. doi: 10.1056/NEJMoa050642.
32. Lan F, Zeng D, Higuchi M, Higgins JP, Strober S. Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003 Jun;9(6):355-63. doi: 10.1016/s1083-8791(03)00108-3.

33. Veeraputhiran M, Yang L, Sundaram V, Arai S, Lowsky R, Miklos D, Meyer E, Muffly L, Negrin R, Rezvani A, Shizuru J, Weng WK, Johnston L. Validation of the hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index in nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Oct;23(10):1744-8. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.06.005.
34. Benjamin J, Chhabra S, Kohrt HE, Lavori P, Laport GG, Arai S, Johnston L, Miklos DB, Shizuru JA, Weng WK, Negrin RS, Lowsky R. Total lymphoid irradiation-antithymocyte globulin conditioning and allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Jun;20(6):837-43. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.02.023.
35. Spinner MA, Fernández-Viña M, Creary LE, Quinn O, Elder L, Arai S, Johnston LJ, Meyer EH, Miklos DB, Muffly LS, Negrin RS, Shizuru JA, Weng WK, Laport GG, Strober S, Lowsky R, Rezvani AR. HLA-mismatched unrelated donor transplantation using TLI-ATG conditioning has a low risk of GVHD and potent antitumor activity. *Blood Adv.* 2017 Jul 25;1(17):1347-57. doi: 10.1182/bloodadvances.2017007716.
36. Spinner MA, Advani RH, Hoppe RT, Lowsky R, Muffly LS. Allogeneic transplantation using TLI-ATG conditioning for Hodgkin lymphoma after failure of autologous transplantation. *Blood Adv.* 2018 Jul 10;2(13):1547-50. doi: 10.1182/bloodadvances.2018021071.
37. Spinner MA, Kennedy VE, Tamaresis JS, Lavori PW, Arai S, Johnston LJ, Meyer EH, Miklos DB, Muffly LS, Negrin RS, Rezvani AR, Shizuru JA, Weng WK, Hoppe RT, Strober S, Lowsky R. Nonmyeloablative TLI-ATG conditioning for allogeneic transplantation: mature follow-up from a large single-center cohort. *Blood Adv.* 2019 Aug 27;3(16):2454-64. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000297.
38. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975 Feb;5(2):112-7. doi: 10.1002/eji.1830050208.
39. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 1975 Aug 15;16(2):216-29. doi: 10.1002/ijc.2910160204.
40. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.
41. Shaffer BC, Hsu KC. Selection of allogeneic hematopoietic cell transplant donors to optimize natural killer cell alloreactivity. *Semin Hematol.* 2020 Oct;57(4):167-74. doi: 10.1053/j.seminhematol.2020.10.005.
42. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990 Dec 15;76(12):2421-38.
43. Parham P, Moffett A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. *Nat Rev Immunol.* 2013 Feb;13(2):133-44. doi: 10.1038/nri3370.

44. Tanaka J, Miller JS. Recent progress in and challenges in cellular therapy using NK cells for hematological malignancies. *Blood Rev.* 2020 Nov;44:100678. doi: 10.1016/j.blre.2020.100678.
45. Cooley S, Parham P, Miller JS. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2018. doi:10.1182/blood-2017-08-752170
46. Long EO. Ready for Prime Time : NK Cell Priming by Dendritic Cells. 2007;15(April):2004-2006. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.001
47. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2369-80. doi: 10.1182/blood-2008-03-143727.
48. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyran D, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997 Dec;7(6):753-63. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80394-5.
49. Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ. Quantifying the protection of activating and inhibiting NK cell receptors during Infection with a CMV-Like Virus. *Front Immunol.* 2014 Jan 30;5:20. doi: 10.3389/fimmu.2014.00020.
50. Gleimer M, Parham P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity.* 2003 Oct;19(4):469-77. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00272-3.
51. Zeiser R, Vago L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2019 Mar 21;133(12):1290-7. doi: 10.1182/blood-2018-10-846824.
52. Crivello P, Zito L, Sizzano F, Zino E, Maiers M, Mulder A, Toffalori C, Naldini L, Ciceri F, Vago L, Fleischhauer K. The impact of amino acid variability on alloreactivity defines a functional distance predictive of permissive HLA-DPB1 mismatches in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Feb;21(2):233-41. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.017.
53. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, Miller CA, Chendamarai E, Duncavage EJ, Klco JM, Helton NM, O'Laughlin M, Fronick CC, Fulton RS, Wilson RK, Wartman LD, Welch JS, Heath SE, Baty JD, Payton JE, Graubert TA, Link DC, Walter MJ, Westervelt P, Ley TJ, DiPersio JF. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med.* 2018 Dec 13;379(24):2330-41. doi: 10.1056/NEJMoa1808777.
54. Heidenreich S, Kröger N. Reduction of Relapse after Unrelated Donor Stem Cell Transplantation by KIR-Based Graft Selection. *Front Immunol.* 2017 Feb 8;8:41. doi: 10.3389/fimmu.2017.00041.
55. Shaffer BC, Hsu KC. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016 Dec;29(4):351-8. doi: 10.1016/j.beha.2016.10.010.

56. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Gooley, TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, Gallagher MM, Malkki M, Petersdorf E, Dupont B, Hsu KC. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med*. 2012;367(9):805-16. doi:10.1056/NEJMoa1200503.
57. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, Weisdorf DJ, Miller JS. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 2011 Sep 8;118(10):2784-92. doi: 10.1182/blood-2011-04-347070.
58. Fleischhauer K, Hsu KC, Shaw BE. Prevention of relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation by donor and cell source selection. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Dec;53(12):1498-507. doi: 10.1038/s41409-018-0218-1.
59. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):709-13. doi: 10.1038/nature03847.
60. Yu J, Venstrom JM, Liu XR, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, Hsu KC. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3875-84. doi: 10.1182/blood-2008-09-177055.
61. Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009 Apr;30(4):143-9. doi: 10.1016/j.it.2009.01.006.
62. Lutz CT. Human leukocyte antigen Bw4 and Bw6 epitopes recognized by antibodies and natural killer cells. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014 Aug;19(4):436-41. doi: 10.1097/MOT.000000000000103.
63. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):708-10. doi: 10.1182/blood-2008-02-137521.
64. Wroblewski EE, Parham P, Guethlein LA. Two to Tango: co-evolution of hominid natural killer cell receptors and MHC. *Front Immunol*. 2019 Feb 19;10:177. doi: 10.3389/fimmu.2019.00177.
65. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Mar 19;367(1590):800-11. doi: 10.1098/rstb.2011.0266.
66. Wright PA. Killer-cell immunoglobulin-like receptor assessment algorithms in haemopoietic progenitor cell transplantation: current perspectives and future opportunities. *HLA*. 2020 May;95(5):435-48. doi: 10.1111/tan.13817.

67. Dulberger CL, McMurtrey CP, Hölzemer A, Neu KE, Liu V, Steinbach AM, Garcia-Beltran WF, Sulak M, Jabri B, Lynch VJ, Altfeld M, Hildebrand WH, Adams EJ. Human leukocyte antigen F presents peptides and regulates immunity through interactions with NK cell receptors. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):1018-29.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.002.
68. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):429-34. doi: 10.1038/ng934.
69. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 2010 Feb 11;115(6):1166-74. doi: 10.1182/blood-2009-09-245746.
70. Vierra-Green C, Roe D, Hou L, Hurley CK, Rajalingam R, Reed E, Lebedeva T, Yu N, Stewart M, Noreen H, Hollenbach JA, Guethlein LA, Wang T, Spellman S, Maiers M. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One*. 2012;7(11):e47491. doi: 10.1371/journal.pone.0047491.
71. Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Guethlein LA, Hilton HG, Pando MJ, Koram KA, Riley EM, Abi-Rached L, Parham P. Co-evolution of human leukocyte antigen (HLA) class I ligands with killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genet*. 2013 Oct;9(10):e1003938. doi: 10.1371/journal.pgen.1003938.
72. Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SG, Miller JS, Parham P, Geraghty DE. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One*. 2010 Dec 29;5(12):e15115. doi: 10.1371/journal.pone.0015115.
73. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol*. 2008 Dec;20(6):343-52. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.003.
74. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol*. 2003 Jun;64(6):648-54. doi: 10.1016/s0198-8859(03)00067-3.
75. Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD - the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(Database issue):D863-9. doi: 10.1093/nar/gkp879.
76. Vilches C, Gardiner CM, Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6416-21. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6416.
77. Vilches C, Pando MJ, Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics*. 2000 Jul;51(8-9):639-46. doi: 10.1007/s002510000184.

78. Trundley AE, Hiby SE, Chang C, Sharkey AM, Santourlidis S, Uhrberg M, Trowsdale J, Moffett A. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics*. 2006 Jan;57(12):904-16. doi: 10.1007/s00251-005-0060-7.
79. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, Cookson WO, Trowsdale J, Traherne JA. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res*. 2012 Oct;22(10):1845-54. doi: 10.1101/gr.137976.112.
80. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SG, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2411-9. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051.
81. Rocha V, Ruggeri A, Spellman S, Wang T, Sobecks R, Locatelli F, Askar M, Michel G, Arcese W, Iori AP, Purtill D, Danby R, Sanz GF, Gluckman E, Eapen M; Eurocord, Cord Blood Committee Cellular Therapy Immunobiology Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Netcord, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-Ligand Matching and Outcomes after Unrelated Cord Blood Transplantation in Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jul;22(7):1284-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.04.007.
82. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999 Jul 1;94(1):333-9.
83. Ruggeri L, Mancusi A, Urbani E, Velardi A. Identifying NK Alloreactive Donors for Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Methods Mol Biol*. 2016;1393:141-5. doi: 10.1007/978-1-4939-3338-9\_14.
84. Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, Stevenson PA, Le Luque JB, Shaffer BC, Rajalingam R, Hou L, Hurley CK, Noreen H, Reed EF, Yu N, Vierra-Green C, Haagenson M, Malkki M, Petersdorf EW, Spellman S, Hsu KC. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 10;35(20):2268-78. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7059.
85. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):433-40. doi: 10.1182/blood-2006-07-038687.
86. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-100. doi: 10.1126/science.1068440.



87. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4878-84. doi: 10.1182/blood-2004-12-4825.
88. Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQueen KL, Guethlein LA, Trachtenberg EA, Haagenson M, Horowitz MM, Klein JP, Weisdorf DJ. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):5058-61. doi: 10.1182/blood-2007-01-065383.
89. Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, Bornhäuser M, Christiansen F, Gratwohl A, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, van Rood JJ, Petersdorf E; International Histocompatibility Working Group. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Aug;12(8):828-36. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.04.008.
90. Weisdorf D, Cooley S, Wang T, Trachtenberg E, Vierra-Green C, Spellman S, Sees JA, Spahn A, Vogel J, Fehniger TA, Woolfrey AE, Devine SM, Ross M, Waller EK, Sobecks RM, McGuirk J, Oran B, Farag SS, Shore T, Van Besien K, Marsh SGE, Guethlein LA, Parham P, Miller JS. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv*. 2020 Feb 25;4(4):740-54. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001053.
91. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SG, Spellman S, Haagenson MD, Saetern K, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4592-600. doi: 10.4049/jimmunol.1302517.
92. Pittari G, Liu XR, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, Chewning JH, Hsu KC, Dupont B. NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4650-60. doi: 10.4049/jimmunol.1202120.
93. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol*. 2005 Oct 15;175(8):5222-9. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5222.
94. Schetelig J, Baldauf H, Heidenreich F, Massalski C, Frank S, Sauter J, Stelljes M, Ayuk FA, Bethge WA, Bug G, Klein S, Wendler S, Lange V, de Wreede LC, Fürst D, Kobbe G, Ottinger HD, Beelen DW, Mytilineos J, Fleischhauer K, Schmidt AH, Bornhäuser M. External validation of models for KIR2DS1/KIR3DL1-informed selection of hematopoietic cell donors fails. *Blood*. 2020 Apr 16;135(16):1386-95. doi: 10.1182/blood.2019002887.

95. Boelen L, Debebe B, Silveira M, Salam A, Makinde J, Roberts CH, Wang ECY, Frater J, Gilmour J, Twigger K, Ladell K, Miners KL, Jayaraman J, Traherne JA, Price DA, Qi Y, Martin MP, Macallan DC, Thio CL, Astemborski J, Kirk G, Donfield SM, Buchbinder S, Khakoo SI, Goedert JJ, Trowsdale J, Carrington M, Kollnberger S, Asquith B. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors strengthen CD8<sup>+</sup> T cell-mediated control of HIV-1, HCV, and HTLV-1. *Sci Immunol*. 2018 Nov 9;3(29):eaao2892. doi: 10.1126/sciimmunol.aao2892.
96. Schetelig J, Baldauf H, Koster L, Kuxhausen M, Heidenreich F, de Wreede LC, Spellman S, van Gelder M, Bruno B, Onida F, Lange V, Massalski C, Potter V, Ljungman P, Schaap N, Hayden P, Lee SJ, Kröger N, Hsu K, Schmidt AH, Yakoub-Agha I, Robin M. Haplotype motif-based models for KIR-genotype informed selection of hematopoietic cell donors fail to predict outcome of patients with myelodysplastic syndromes or secondary acute myeloid leukemia. *Front Immunol*. 2021 Jan 19;11:584520. doi: 10.3389/fimmu.2020.584520.
97. Krieger E, Sabo R, Moezzi S, Cain C, Roberts C, Kimball P, Chesney A, McCarty J, Keating A, Romee R, Wiedl C, Qayyum R, Toor A. Killer immunoglobulin-like receptor-ligand interactions predict clinical outcomes following unrelated donor transplantations. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020 Apr;26(4):672-82. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.10.016.
98. Krieger E, Qayyum R, Keating A, Toor A. Increased donor inhibitory KIR with known HLA interactions provide protection from relapse following HLA matched unrelated donor HCT for AML. *Bone Marrow Transplant*. 2021 Nov;56(11):2714-22. doi: 10.1038/s41409-021-01393-9.
99. Erlich HA. HLA typing using next generation sequencing: An overview. *Hum Immunol*. 2015 Dec;76(12):887-90. doi: 10.1016/j.humimm.2015.03.001.
100. Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Marin WM, Norberg SJ, Ashouri E, Jayaraman J, Wroblewski EE, Trowsdale J, Rajalingam R, Oksenberg JR, Chiaroni J, Guethlein LA, Traherne JA, Ronaghi M, Parham P. Defining KIR and HLA Class I genotypes at highest resolution via high-throughput sequencing. *Am J Hum Genet*. 2016 Aug 4;99(2):375-91. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.06.023.
101. Kohrt HE, Turnbull BB, Heydari K, Shizuru JA, Laport GG, Miklos DB, Johnston LJ, Arai S, Weng WK, Hoppe RT, Lavori PW, Blume KG, Negrin RS, Strober S, Lowsky R. TLI and ATG conditioning with low risk of graft-versus-host disease retains antitumor reactions after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):1099-109. doi: 10.1182/blood-2009-03-211441.
102. Armand P, Kim HT, Logan BR, Wang Z, Alyea EP, Kalaycio ME, Maziarz RT, Antin JH, Soiffer RJ, Weisdorf DJ, Rizzo JD, Horowitz MM, Saber W. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2014 Jun 5;123(23):3664-71. doi: 10.1182/blood-2014-01-552984.

103. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood*. 1981 Feb;57(2):267-76. doi:10.1182/blood.v57.2.267.267.
104. Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Müller WE, Wetter T, Suhai S. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res*. 2004 Jun;14(6):1147-59. doi: 10.1101/gr.1917404.
105. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
106. Milius RP, Mack SJ, Hollenbach JA, Pollack J, Heuer ML, Gragert L, Spellman S, Guethlein LA, Trachtenberg EA, Cooley S, Bochtler W, Mueller CR, Robinson J, Marsh SG, Maiers M. Genotype List String: a grammar for describing HLA and KIR genotyping results in a text string. *Tissue Antigens*. 2013 Aug;82(2):106-12. doi: 10.1111/tan.12150.
107. Gumperz JE, Barber LD, Valiante NM, Percival L, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol*. 1997 Jun 1;158(11):5237-41.
108. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*. 1995 Mar 1;181(3):1133-44. doi: 10.1084/jem.181.3.1133.
109. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004 Aug 6;305(5685):872-4. doi: 10.1126/science.1097670.
110. Guethlein LA, Beyzaie N, Nemat-Gorgani N, Wang T, Ramesh V, Marin WM, Hollenbach JA, Schetelig J, Spellman SR, Marsh SGE, Cooley S, Weisdorf DJ, Norman PJ, Miller JS, Parham P. Following transplantation for acute myelogenous leukemia, donor *KIR Cen B02* better protects against relapse than *KIR Cen B01*. *J Immunol*. 2021 Jun 15;206(12):3064-72. doi: 10.4049/jimmunol.2100119.
111. Ou FS, Le-Rademacher JG, Ballman KV, Adjei AA, Mandrekar SJ. Guidelines for Statistical Reporting in Medical Journals. *J Thorac Oncol*. 2020 Nov;15(11):1722-1726. doi: 10.1016/j.jtho.2020.08.019.
112. Verma J, Abdel-Salam GA-S. Testing statistical assumptions in research. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2019. 224p.
113. Pinitilie M. Competing risks: a practical perspective. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. 240p.

114. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94(446):496-509. doi:10.1080/01621459.1999.10474144.
115. Zhang C, Liu Y, Jia Y. SAS® Macros on Performing Competing Risks Survival Data: CIF Plot, Backward Elimination Fine & Gray's Model and Cause-Specific Hazard Model. *J Med Stat Informatics.* 2019;7(1):2. doi:10.7243/2053-7662-7-2
116. Mendrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. Cutpoint Determination Methods in Survival Analysis Using SAS. *Stat Data Anal.* 2002;(1997):1-5. Available from: <http://www2.sas.com/proceedings/sugi28/261-28.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/FEC48C2F-A83C-4C4F-9B50-C5141FE03CE8>.
117. Contal C, O'Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Stat Data Anal.* 1999;30(3):253-70. doi:10.1016/S0167-9473(98)00096-6.
118. Kramar A, Mathoulin-pélissier S, Mathoulin-pélissier S. *Méthodes Biostatistiques Appliquées à La Recherche Clinique En Cancérologie.* Vol 8.; France: John Libbey Eurotext. 2022. 520p.
119. Sathish N, Wu CA. Let's flip: an approach to understand median follow-up by the reverse Kaplan-Meier estimator from a statistical programmer's perspective. *PharmaSUG.* 2019. Available from: <https://www.pharmasug.org/proceedings/2019/ST/PharmaSUG-2019-ST-081.pdf>.
120. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials.* 1996 Aug;17(4):343-6. doi: 10.1016/0197-2456(96)00075-x.
121. Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C, Vago L, Kröger N. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018 Nov;53(11):1379-89. doi: 10.1038/s41409-018-0171-z.
122. Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, Graef T, McQueen KL, Guethlein LA, Carrington CV, Chandanayingyong D, Chang YH, Crespí C, Saruhan-Direskeneli G, Hameed K, Kamkamidze G, Koram KA, Layrisse Z, Matamoros N, Milà J, Park MH, Pitchappan RM, Ramdath DD, Shiao MY, Stephens HA, Struik S, Tyan D, Verity DH, Vaughan RW, Davis RW, Fraser PA, Riley EM, Ronaghi M, Parham P. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res.* 2009 May;19(5):757-69. doi: 10.1101/gr.085738.108.
123. Marin WM, Dandekar R, Augusto DG, Yusufali T, Heyn B, Hofmann J, Lange V, Sauter J, Norman PJ, Hollenbach JA. High-throughput Interpretation of Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor Short-read Sequencing Data with PING. *PLoS Comput Biol.* 2021 Aug 2;17(8):e1008904. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008904.
124. Hou L, Chen M, Ng J, Hurley CK. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun.* 2012 Jan;13(1):47-58. doi: 10.1038/gene.2011.52.

125. Whang DH, Park H, Yoon JA, Park MH. Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol.* 2005 Feb;66(2):146-54. doi: 10.1016/j.humimm.2004.10.013.
126. Yawata M, Yawata N, McQueen KL, Cheng NW, Guethlein LA, Rajalingam R, Shilling HG, Parham P. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics.* 2002 Nov;54(8):543-50. doi: 10.1007/s00251-002-0497-x.
127. Augusto DG, Amorim LM, Farias TD, Petzl-Erler ML. KIR and HLA genotyping of Japanese descendants from Curitiba, a city of predominantly European ancestry from Southern Brazil. *Hum Immunol.* 2016 Apr;77(4):336-7. doi: 10.1016/j.humimm.2016.01.011.
128. Amorim LM, Augusto DG, Nemat-Gorgani N, Montero-Martin G, Marin WM, Shams H, Dandekar R, Caillier S, Parham P, Fernández-Viña MA, Oksenberg JR, Norman PJ, Hollenbach JA. High-resolution characterization of *KIR* Genes in a large north american cohort reveals novel details of structural and sequence diversity. *Front Immunol.* 2021 May 7;12:674778. doi: 10.3389/fimmu.2021.674778.
129. Dubreuil L, Maniangou B, Chevallier P, Quéméner A, Legrand N, Béné MC, Willem C, David G, Alizadeh M, Makanga DR, Cesbron A, Gendzekhadze K, Gagne K, Retière C. Centromeric KIR AA individuals harbor particular KIR alleles conferring beneficial NK cell features with implications in haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Cancers (Basel).* 2020 Dec 1;12(12):3595. doi: 10.3390/cancers12123595.
130. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Killer immunoglobulin-like receptor. Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3825-7. doi: 10.1182/blood-2002-04-1197.
131. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):814-9. doi: 10.1182/blood-2003-01-0091.
132. Schaffer M, Malmberg KJ, Ringdén O, Ljunggren HG, Remberger M. Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2004 Oct 15;78(7):1081-5. doi: 10.1097/01.tp.0000137103.19717.86.
133. Elmaagacli AH, Ottinger H, Koldehoff M, Peceny R, Steckel NK, Trenscher R, Biersack H, Grosse-Wilde H, Beelen DW. Reduced risk for molecular disease in patients with chronic myeloid leukemia after transplantation from a KIR-mismatched donor. *Transplantation.* 2005 Jun 27;79(12):1741-7. doi: 10.1097/01.tp.0000164500.16052.3c.

134. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;14(1):75-87. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.09.012.
135. Huang XJ, Zhao XY, Liu DH, Liu KY, Xu LP. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):848-51. doi: 10.1038/sj.leu.2404566.
136. Mancusi A, Ruggeri L, Urbani E, Pierini A, Massei MS, Carotti A, et al. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood*. 2015 May;125(20):3173–82.
137. Yahng SA, Jeon YW, Yoon JH, Shin SH, Lee SE, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Lee S, Min CK, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim HJ. Negative Impact of Unidirectional Host-versus-Graft Killer Cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatch on transplantation outcomes after unmanipulated haploidentical peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):316-23. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.018.
138. Zhao XY, Luo XY, Yu XX, Zhao XS, Han TT, Chang YJ, Huo MR, Xu LP, Zhang XH, Liu KY, Li D, Jiang ZF, Huang XJ. Recipient-donor KIR ligand matching prevents CMV reactivation post-haploidentical T cell-replete transplantation. *Br J Haematol*. 2017 Jun;177(5):766-781. doi: 10.1111/bjh.14622.
139. Wanquet A, Bramanti S, Harbi S, Fürst S, Legrand F, Faucher C, Granata A, Calmels B, Lemarie C, Picard C, Chabannon C, Weiller PJ, Castagna L, Blaise D, Devillier R. Killer cell immunoglobulin-like receptor-ligand mismatch in donor versus recipient direction provides better graft-versus-tumor effect in patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic T cell-replete haploidentical transplantation followed by post-transplant cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Mar;24(3):549-54. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.11.042.
140. Shimoni A, Labopin M, Lorentino F, Van Lint MT, Koc Y, Gülbas Z, Tischer J, Bruno B, Blaise D, Pioltelli P, Afanasyev B, Ciceri F, Mohty M, Nagler A. Killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatching and outcome after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Leukemia*. 2019 Jan;33(1):230-239. doi: 10.1038/s41375-018-0170-5.
141. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, Niethammer D, Handgretinger R. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):644-50. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.644.
142. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PJ, Mahendra P, Craddock CF, Moss PA, Briggs DC. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1521-6. doi: 10.1182/blood-2003-02-0438.

143. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeboller H, Rosenmayr A, Fae I, Fischer GF, et al. KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Jul;44(2):97–103.
144. Ludajic K, Balavarca Y, Bickebölller H, Rosenmayr A, Fae I, Fischer GF, Kouba M, Pohlreich D, Kalhs P, Greinix HT. KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Jul;44(2):97-103. doi: 10.1038/bmt.2008.432.
145. Linn YC, Phang CY, Lim TJ, Chong SF, Heng KK, Lee JJ, Loh Y, Hwang W, Goh YT, Koh M. Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Jun;45(6):1031-7. doi: 10.1038/bmt.2009.303.
146. Gagne K, Busson M, Bignon JD, Balère-Appert ML, Loiseau P, Dormoy A, Dubois V, Perrier P, Jollet I, Bois M, Masson D, Moine A, Absi L, Blaise D, Charron D, Raffoux C; ARS2000 FRM and FGM group. Donor KIR3DL1/3DS1 gene and recipient Bw4 KIR ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Nov;15(11):1366-75. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.015.
147. Björklund AT, Schaffer M, Fauriat C, Ringdén O, Remberger M, Hammarstedt C, Barrett AJ, Ljungman P, Ljunggren HG, Malmberg KJ. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood.* 2010 Apr 1;115(13):2686-94. doi: 10.1182/blood-2009-07-229740.
148. Wu GQ, Zhao YM, Lai XY, Luo Y, Tan YM, Shi JM, Li L, Zheng WY, Zhang J, Hu XR, Jin AY, He JS, Xie WZ, Ye XJ, Cai Z, Lin MF, Huang H. The beneficial impact of missing KIR ligands and absence of donor KIR2DS3 gene on outcome following unrelated hematopoietic SCT for myeloid leukemia in the Chinese population. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Oct;45(10):1514-21. doi: 10.1038/bmt.2010.3.
149. Zhou H, Bao X, Wu X, Tang X, Wang M, Wu D, He J. Donor selection for killer immunoglobulin-like receptors B haplotype of the centromeric motifs can improve the outcome after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Jan;20(1):98-105.
150. Sobecks RM, Wang T, Askar M, Gallagher MM, Haagensohn M, Spellman S, Fernandez-Vina M, Malmberg KJ, Müller C, Battiwalla M, Gajewski J, Verneris MR, Ringdén O, Marino S, Davies S, Dehn J, Bornhäuser M, Inamoto Y, Woolfrey A, Shaw P, Pollack M, Weisdorf D, Miller J, Hurley C, Lee SJ, Hsu K. Impact of KIR and HLA Genotypes on outcomes after reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Sep;21(9):1589-96. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.002.

151. Faridi RM, Kemp TJ, Dharmani-Khan P, Lewis V, Tripathi G, Rajalingam R, Daly A, Berka N, Storek J, Masood Khan F. Donor-recipient matching for KIR genotypes reduces chronic GVHD and missing inhibitory KIR Ligands protect against relapse after myeloablative, HLA matched hematopoietic cell transplantation. *PLoS One*. 2016 Jun 24;11(6):e0158242. doi: 10.1371/journal.pone.0158242.
152. Neuchel C, Fürst D, Niederwieser D, Bunjes D, Tsamadou C, Wulf G, Pfreundschuh M, Wagner E, Stuhler G, Einsele H, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Impact of donor activating KIR Genes on HSCT outcome in C1-Ligand Negative Myeloid Disease patients transplanted with unrelated donors - a retrospective study. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0169512. doi: 10.1371/journal.pone.0169512.
153. Arima N, Kanda J, Tanaka J, Yabe T, Morishima Y, Kim SW, Najima Y, Ozawa Y, Eto T, Kanamori H, Mori T, Kobayashi N, Kondo T, Nakamae H, Uchida N, Inoue M, Fukuda T, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y. Homozygous HLA-C1 is associated with reduced risk of relapse after HLA-matched transplantation in patients with myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Apr;24(4):717-725. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.11.029.
154. Arima N, Kanda J, Yabe T, Morishima Y, Tanaka J, Kako S, Sakaguchi H, Kato M, Ohashi K, Ozawa Y, Fukuda T, Ota S, Tachibana T, Onizuka M, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y. Increased relapse risk of acute lymphoid leukemia in homozygous HLA-C1 patients after HLA-matched allogeneic transplantation: A Japanese National Registry Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020 Mar;26(3):431-437. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.10.032.
155. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SG, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Weisdorf DJ. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009 Jan 15;113(3):726-32. doi: 10.1182/blood-2008-07-171926.
156. Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N, Haas P, Socié G, Toubert A, Charron D, Loiseau P. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Sep;38(6):437-44. doi: 10.1038/sj.bmt.1705468.
157. Zaia JA, Sun JY, Gallez-Hawkins GM, Thao L, Oki A, Lacey SF, Dagens A, Palmer J, Diamond DJ, Forman SJ, Senitzer D. The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Mar;15(3):315-25. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.11.030.
158. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, Petersdorf E, Hsu KC. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3162-5. doi: 10.1182/blood-2009-08-236943.



159. Tomblyn M, Young JA, Haagenson MD, Klein JP, Trachtenberg EA, Storek J, Spellman SR, Cooley S, Miller JS, Weisdorf DJ; CIBMTR Infection and Immune Reconstitution Working Committee. Decreased infections in recipients of unrelated donor hematopoietic cell transplantation from donors with an activating KIR genotype. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Aug;16(8):1155-61. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.02.024.
160. Impola U, Turpeinen H, Alakulppi N, Linjama T, Volin L, Niittyvuopio R, Partanen J, Koskela S. Donor haplotype B of NK KIR receptor reduces the relapse risk in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation of AML patients. *Front Immunol.* 2014 Aug 25;5:405. doi: 10.3389/fimmu.2014.00405.
161. Bao X, Wang M, Zhou H, Zhang H, Wu X, Yuan X, Li Y, Wu D, He J. Donor killer immunoglobulin-like receptor profile Bx1 imparts a negative effect and centromeric B-specific gene motifs render a positive effect on standard-risk acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patient survival after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Feb;22(2):232-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.007.
162. 159. Bachanova V, Weisdorf DJ, Wang T, Marsh SGE, Trachtenberg E, Haagenson MD, Spellman SR, Ladner M, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Cooley SA. Donor KIR B Genotype improves progression-free survival of non-hodgkin lymphoma patients receiving unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Sep;22(9):1602-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.05.016.
163. Burek Kamenaric M, Stingl Jankovic K, Grubic Z, Serventi Seiwert R, Maskalan M, Nemet D, Mikulic M, Zunec R. The impact of KIR2DS4 gene on clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol.* 2017 Feb;78(2):95-102. doi: 10.1016/j.humimm.2016.11.010.
164. Hosokai R, Masuko M, Shibasaki Y, Saitoh A, Furukawa T, Imai C. Donor killer immunoglobulin-like receptor haplotype B/x induces severe acute graft-versus-host disease in the presence of human leukocyte antigen mismatch in T cell-replete hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(4):606-611. doi:10.1016/j.bbmt.2016.12.638.
165. Heatley SL, Mullighan CG, Doherty K, Danner S, O'Connor GM, Hahn U, Szer J, Schwarzer A, Bradstock K, Sullivan LC, Bardy PG, Brooks AG. Activating KIR haplotype influences clinical outcome following HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *HLA.* 2018 Jun 25. doi: 10.1111/tan.13327.
166. Tordai A, Bors A, Kiss KP, Balassa K, Andrikovics H, Batai A, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Torbagyi E, Lengyel L, Barta A, Remenyi P, Masszi T. Donor KIR2DS1 reduces the risk of transplant related mortality in HLA-C2 positive young recipients with hematological malignancies treated by myeloablative conditioning. *PLoS One.* 2019 Jun 25;14(6):e0218945. doi: 10.1371/journal.pone.0218945.
167. Nakamura R, Gendzekhadze K, Palmer J, Tsai NC, Mokhtari S, Forman SJ, Zaia JA, Senitzer D, Marcucci G, Stein A. Influence of donor KIR genotypes on reduced relapse risk in acute myelogenous leukemia after hematopoietic stem cell transplantation in patients with CMV reactivation. *Leuk Res.* 2019 Dec;87:106230. doi: 10.1016/j.leukres.2019.106230.

168. Bultitude WP, Schellekens J, Szydlo RM, Anthias C, Cooley SA, Miller JS, Weisdorf DJ, Shaw BE, Roberts CH, Garcia-Sepulveda CA, Lee J, Pearce RM, Wilson MC, Potter MN, Byrne JL, Russell NH, MacKinnon S, Bloor AJ, Patel A, McQuaker IG, Malladi R, Tholouli E, Orchard K, Potter VT, Madrigal JA, Mayor NP, Marsh SGE. 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*. 2020 Oct;55(10):1975-1984. doi: 10.1038/s41409-020-0858-9.
169. 144. Shaffer BC, Le Luduec JB, Park S, Devlin S, Archer A, Davis E, Cooper C, Nhaissi M, Suri B, Wells D, Tamari R, Papadopoulos E, Jakubowski AA, Giralt S, Hsu KC. Prospective KIR genotype evaluation of hematopoietic cell donors is feasible with potential to benefit patients with AML. *Blood Adv*. 2021 Apr 13;5(7):2003-11. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002701.
170. Moyer AM, Hashmi SK, Kroning CM, Patnaik M, Litzow M, Gastineau DA, Hogan WJ, Jacob EK, Kreuter JD, Wakefield LL, Gandhi MJ. Clinical impact of KIR haplotypes in 10/10 HLA-matched unrelated donor-recipient pairs undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2023 Mar;64(3):671-678. doi: 10.1080/10428194.2022.2151838.
171. Vargas LB, Dourado RM, Amorim LM, Ho B, Calonga-Solís V, Issler HC, Marin WM, Beltrame MH, Petzl-Erler ML, Hollenbach JA, Augusto DG. Single nucleotide polymorphism in *KIR2DL1* is associated with HLA-C expression in Global Populations. *Front Immunol*. 2020 Aug 21;11:1881. doi: 10.3389/fimmu.2020.01881.
172. Béziat V, Traherne JA, Liu LL, Jayaraman J, Enqvist M, Larsson S, Trowsdale J, Malmberg KJ. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4703-7. doi: 10.1182/blood-2012-10-461442.
173. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, Ugarte-Torres A, Khan FM, Luider J, Auer-Grzesiak I, Mansoor A, Russell JA, Daly A, Stewart DA, Maloney D, Boeckh M, Storek J. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1258-75. doi: 10.3109/14653249.2012.715243.
174. Petersen SL, Ryder LP, Björk P, Madsen HO, Heilmann C, Jacobsen N, Sengeløv H, Vindeløv LL. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Jul;32(1):65-72. doi: 10.1038/sj.bmt.1704084.
175. Gao F, Ye Y, Gao Y, Huang H, Zhao Y. Influence of KIR and NK cell reconstitution in the outcomes of hematopoietic stem cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11(September 2020):1-17. doi:10.3389/fimmu.2020.02022.
176. Boudreau JE, Le Luduec JB, Hsu KC. Development of a novel multiplex PCR assay to detect functional subtypes of KIR3DL1 alleles. *PLoS One*. 2014 Jun 11;9(6):e99543. doi: 10.1371/journal.pone.0099543.

177. Weisdorf D, Cooley S, Wang T, Trachtenberg E, Haagenson MD, Vierra-Green C, Spellman S, Spahn A, Vogel J, Kobusingye H, Fehninger T, Woolfrey A, Devine S, Ross M, Waller EK, Sobecks R, Parham P, Guethlein LA, Marsh SGE, Miller J; participating center writing committee. KIR donor selection: feasibility in identifying better donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Jan;25(1):e28-e32. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.08.022.
178. Maniangou B, Retière C, Gagne K. Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Clin Biol.* 2018 Feb;25(1):87-9. doi: 10.1016/j.traci.2017.07.005.
179. Zou J, Kongtim P, Srour SA, Greenbaum U, Schetelig J, Heidenreich F, Baldauf H, Moore B, Saengboon S, Carmazzi Y, Rondon G, Ma Q, Rezvani K, Shpall EJ, Champlin RE, Ciurea SO, Cao K. Donor selection for KIR alloreactivity is associated with superior survival in haploidentical transplant with PTCy. *Front Immunol.* 2022 Oct 13;13:1033871. doi: 10.3389/fimmu.2022.1033871.
180. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, Riba M, Oliveira G, Bucci G, Barcella M, Spinelli O, Greco R, Crucitti L, Cieri N, Noviello M, Manfredi F, Montaldo E, Ostuni R, Naldini MM, Gentner B, Waterhouse M, Zeiser R, Finke J, Hanoun M, Beelen DW, Gojo I, Luznik L, Onozawa M, Teshima T, Devillier R, Blaise D, Halkes CJM, Griffioen M, Carrabba MG, Bernardi M, Peccatori J, Barlassina C, Stupka E, Lazarevic D, Tonon G, Rambaldi A, Cittaro D, Bonini C, Fleischhauer K, Ciceri F, Vago L. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med.* 2019 Apr;25(4):603-611. doi: 10.1038/s41591-019-0400-z.
181. Ugolini S, Arpin C, Anfossi N, Walzer T, Cambiaggi A, Förster R, Lipp M, Toes RE, Melief CJ, Marvel J, Vivier E. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol.* 2001 May;2(5):430-5. doi: 10.1038/87740.
182. Crouse J, Xu HC, Lang PA, Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol.* 2015 Jan;36(1):49-58. doi: 10.1016/j.it.2014.11.001.
183. Karabon L, Jedynak A, Giebel S, Wołowiec D, Kielbinski M, Woszczyk D, Kapelko-Slowik K, Kuliczkowski K, Frydecka I. KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia and the clinical course of disease. *Tissue Antigens.* 2011 Aug;78(2):129-38. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01721.x.
184. MacFarlane AW 4th, Jillab M, Smith MR, Alpaugh RK, Cole ME, Litwin S, Millenson MM, Al-Saleem T, Cohen AD, Campbell KS. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology.* 2017 May 19;6(7):e1330235. doi: 10.1080/2162402X.2017.1330235.

185. Bachanova V, Weisdorf DJ, Wang T, Marsh SGE, Cereb N, Haagenson MD, Spellman SR, Lee SJ, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Cooley SA. Donor Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotype Does Not Improve Graft-versus-Leukemia Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia after Unrelated Donor Transplant: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 May;25(5):949-54. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.763.
186. Vago L, Forno B, Sormani MP, Crocchiolo R, Zino E, Di Terlizzi S, Lupo Stanghellini MT, Mazzi B, Perna SK, Bondanza A, Middleton D, Palini A, Bernardi M, Bacchetta R, Peccatori J, Rossini S, Roncarolo MG, Bordignon C, Bonini C, Ciceri F, Fleischhauer K. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3488-99. doi: 10.1182/blood-2007-07-103325.5