

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA



TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA
Curriculum Biomedico-Biomolecolare
LM-6

**Mismatch permissivi e non permissivi nel trapianto
aploidentico di cellule staminali ematopoietiche: il ruolo
del locus HLA-DPB1***

Relatore: Dott.ssa Lia Mele

Candidata: Rosa Federica Sanfilippo

Correlatore: Dott. Mauro Patrone

Matricola: 20030271

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 4
1.1 Struttura e funzione del complesso maggiore di istocompatibilità	4
1.2 Le molecole HLA	7
1.2.1 Le molecole HLA di classe I	7
1.2.2 Espressione degli antigeni di classe I	8
1.2.3 Presentazione dell'antigene sulle molecole di classe I	9
1.2.4 Le molecole d HLA di classe II	10
1.2.5 Espressione degli antigeni di classe II	12
1.2.6 Presentazione dell'antigene sulle molecole di classe II	13
1.2.7 Le molecole HLA di classe III	14
1.2.8 Il ruolo del locus HLA-DPB1*	15
1.3 Tecniche di tipizzazione	17
1.3.1 Tecniche molecolari	17
1.4 Cellule staminali emopoietiche	19
1.5 Trapianto di cellule staminali emopoietiche	21
1.5.1 Fonti delle cellule staminali emopoietiche	22
1.5.2 Tipologie di trapianto: allogenico e autologo	23
1.5.3 Trapianto aploidentico	27
1.6 Ruolo dell'HLA sull'esito del trapianto	29
1.6.1 Rigetto	29
1.6.2 GvHD	30
1.6.3 Sopravvivenza	32
1.7 Permissività del locus DPB1	33
2. SCOPO DEL LAVORO	35
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 Estrazione del DNA	37
3.2 Lettura con lo spettrofotometro	38
3.3 Semina su gel di agarosio e corsa elettroforetica	40
3.4 LabType SSO con strumento LABScan 3D	41
3.5 PCR-SSP	44
3.6 Analisi della permissività del mismatch HLA-DPB1*	45

4. RISULTATI	47
4.1 Coppie donatore-paziente e dati clinici	47
4.2 Mismatch permissivi e mismatch non permissivi	47
4.3 GvHD	50
4.3.1 GvHD acuta	50
4.3.2 GvHD cronica	51
4.3.3 Mismatch permissivi e non permissivi e GvHD acuta e cronica	51
4.4 Mismatch permissivi e non permissivi e attecchimento	52
4.5 Recidiva	52
4.5.1 Mismatch permissivi e non permissivi e recidiva	53
4.6 Sopravvivenza	53
4.6.1 Mismatch permissivi e non permissivi e sopravvivenza	54
5. DISCUSSIONE	55
5.1 Coppie donatore-paziente e diagnosi	56
5.2 Alleli HLA-DPB1*	56
5.3 GvHD	57
5.4 Attecchimento	57
5.5 Recidiva	58
5.6 Sopravvivenza	58
6. CONCLUSIONI	59
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	63
8. RINGRAZIAMENTI	71

1. INTRODUZIONE

In questo percorso discuteremo dell'ampio e complesso mondo del complesso HLA. È ormai risaputo che la compatibilità HLA tra donatore e paziente è molto importante nei trapianti di cellule staminali ematopoietiche (**CSE**) e di organo. Nello specifico tratteremo il *locus* **HLA-DPB1*** e di come i mismatch (**MM**), permissivi e non permissivi, possano influire sul buon esito del trapianto allogenico.

1.1 Struttura e funzione del complesso maggiore di istocompatibilità

Il sistema *dell'antigene leucocitario umano*, o semplicemente **HLA**, è il *locus* dei geni che codificano proteine presenti nel genoma di tutti i vertebrati, in forma simile per organizzazione genica e funzione.

La storia dell'**MHC** risale agli anni Quaranta; grazie agli studi condotti da **George Snell** si era scoperto il suo importante ruolo da mediatore del rigetto di tessuto nei topi (D. Roopenian, 2014). La svolta, però, si registra nei successivi anni Cinquanta, quando cioè venne individuato l'alloantigene a livello dei leucociti umani, che sarebbe poi divenuto il "primo" **antigene leucocitario umano** (E. Thorsby, 2009) o, semplicemente, **HLA** (dall'inglese *Human Leukocyte Antigen*); il merito di tale importante scoperta va al dottor **Jean Dausset**.

Il complesso maggiore di istocompatibilità (nell'uomo), si trova locato sul **braccio corto** del **cromosoma 6**, come possiamo notare dalla figura n.1.

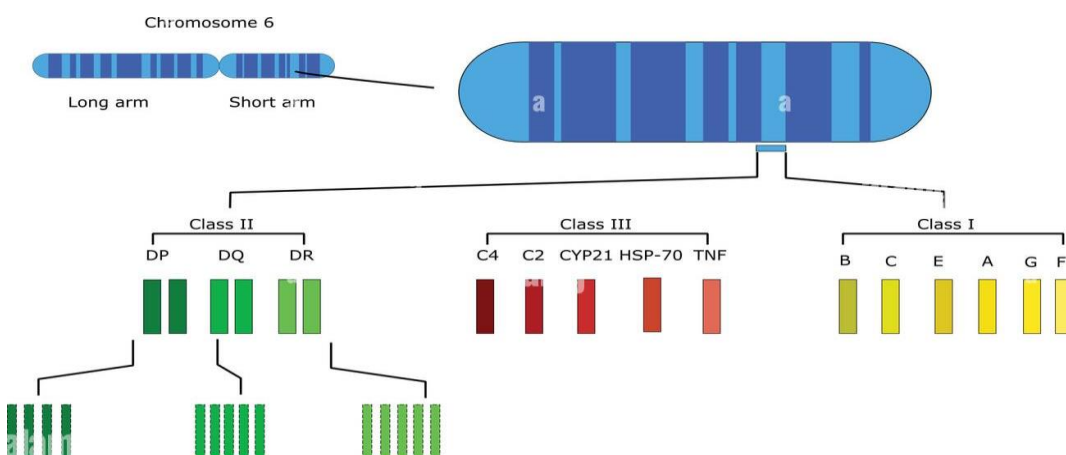


Figura n.1: il cromosoma 6 umano

Ad oggi sappiamo che il **complesso maggiore di istocompatibilità** o, più brevemente, **MHC** (dall'inglese *Major Histocompatibility Complex*) è una regione di geni altamente polimorfici che

codificano per alcune delle molecole coinvolte nella risposta immunitaria; questi geni esercitano un importantissimo ruolo primario sia a livello della compatibilità tissutale che a livello delle reazioni umorali e cellulari; consentono al sistema immunitario di distinguere le componenti estranee all'organismo, definite "**non-self**", da quelle facenti parte dell'organismo, definite "**self**". Quindi, le cellule che esprimono molecole HLA compatibili, vengono considerate *self* e, di conseguenza, non vengono attaccate dal sistema immunitario, al contrario di quelle che esprimono molecole HLA diverse, o in qualche modo alterate che, quindi, vengono riconosciute come *non-self*.

Facendo riferimento alla figura n. 2, notiamo diverse regioni a livello del cromosoma 6:

- la **regione DR, DQ, DP** che include i geni di classe II. È situata in posizione più centrale rispetto al centromero e si estende tra 300-1000 pb;
- la **regione ABC** che include i geni di classe I e si estende tra 2000-3500 pb;
- la **regione di classe III** che si estende tra 1400-1900 pb e include i geni che codificano per i fattori del complemento, quali *C2* e *C4* e anche proteine della risposta immunitaria, quali *TNF α* e il *TNF β* .

Tali geni si dividono in tre classi (figura n.2) in base al tipo di proteina che codificano; soltanto i geni di classe I e II determinano la compatibilità dei tessuti (S. J. H Do Monte et al.; 2004).

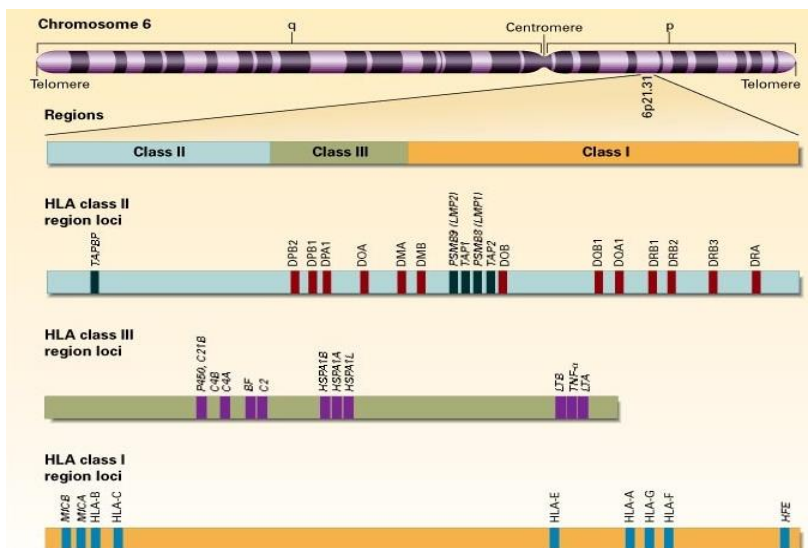


Figura n.2: organizzazione cromosoma 6 umano

Questi geni vengono trasmessi dai genitori ai figli seguendo i principi della segregazione mendeliana; i geni su entrambi i cromosomi, sono espressi in maniera **co-dominante**. La codominanza è un'altra peculiarità del sistema HLA ed è un evento che si riscontra quando due alleli si manifestano in modo completo.

Un'altra delle proprietà, tra le più importanti e caratteristiche, dei *loci* MHC è il cosiddetto **polimorfismo**; ecco perché il sistema HLA è altamente informativo negli studi genetici sulle popolazioni (S. J. H Do Monte et al.; 2004). Significa che esistono molte varianti diverse, o semplicemente alleli, per ogni gene: a queste varianti viene associata una frequenza, nella popolazione, superiore all'1% (Villa et al., 1993; Carcassi¹ et al., 2001; Albert et al., 2002). I polimorfismi genetici possono essere determinati da sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi o di sequenze di DNA, e li troviamo sia all'interno di regioni codificanti, o **esoni**, sia all'interno di regioni non codificanti, o **introni**. Ogni individuo mostra il 99,99% di identità genetica rispetto ad un altro, ed il restante 0,1% rappresenta la variabilità individuale che, in particolare, è dovuta alla presenza dei polimorfismi genetici.

Si stima che circa ogni 300 nucleotidi si manifesti un polimorfismo, il più comune dei quali, è associato alla mutazione di un singolo nucleotide o **SNP** (dall'inglese *Single Nucleotide Polymorphisms*) e circa l'1% di questi non sia silente ma si traduca in variazioni fenotipiche.

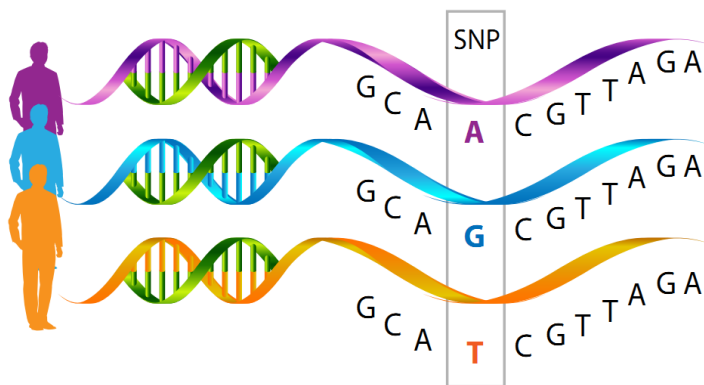


Figura n.3: SNP

Gruppi di queste piccole variazioni vanno a conferire all'individuo una predisposizione o suscettibilità allo sviluppo di eventi patologici, in quanto gli *SNPs* possono portare a delle modificazioni, qualitative o quantitative, a livello proteico, causando suscettibilità individuale verso lo sviluppo di particolari patologie (Randi, 2011).

Un elevato polimorfismo porta con sé sia vantaggi che svantaggi: sicuramente il vantaggio più grande è che conferisce all'individuo una maggiore capacità di risposta immunitaria, permettendo così al sistema immunitario di poter riconoscere un'ampia varietà di patogeni; lo svantaggio maggiore, invece, è l'elevata possibilità che questa diversità genica sia causa diretta di reazioni immunitarie indesiderate (come nei trapianti d'organo; in questo caso risulta fondamentale trovare un donatore con un MHC il più possibile simile a quello del ricevente, per evitare una possibile complicazione). Il polimorfismo del sistema HLA determina l'unicità

dell'individuo, anche se risulta invece ristretto in ambito familiare, poiché esiste una probabilità di avere identità HLA pari a circa il 30% nei fratelli (Arcese et al., 1998). Questa importante proprietà, consente di utilizzare la tipizzazione HLA come strumento di indagine, poiché la frequenza degli alleli HLA e il modello alplotipico, sono caratteristici di ciascuna etnia e popolazione (S. J. H Do Monte et al.; 2004).

1.2 Le molecole HLA

Le molecole HLA hanno una duplice funzione:

- presentare ai linfociti T frammenti di proteine (**antigeni**) provenienti da virus, batteri o altri agenti patogeni. I linfociti T, a loro volta, hanno il compito di iniziare una risposta immunitaria;
- sono importanti nel trapianto d'organo e nella risposta immunitaria verso il tessuto trapiantato.

1.2.1 Le molecole HLA di classe I

Le molecole di **classe I** sono **eterodimeri**, costituiti da due glicoproteine legate non covalentemente:

- **catena α o catena pesante**: ha un peso di 44 KDa ed è codificata da un gene MHC I. La catena α si ripiega e forma tre domini extracellulari, chiamati **$\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$** . Attraverso varie analisi è stato visto che i domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formano una struttura particolare, costituita da 8 piani β -antiparalleli fiancheggiati da 2 α -eliche, creando una zona nella quale avviene il legame del peptide antigenico (Bjorkman et al., 1987). Il dominio $\alpha 3$ è, invece, una regione molto conservata e contiene un sito che permette il legame con la $\beta 2$ -microglobulina. I due domini extracellulari N-terminali della catena α , contengono gli amminoacidi polimorfici, che vengono riconosciuti dalle cellule T nelle reazioni di trapianto. Si viene a creare una tasca dalla quale sporgono dei residui amminoacidici; quest'ultimi espongono una serie di gruppi chimici che poi permettono il legame di peptidi diversi. Questa tasca ha le dimensioni tali per cui permette di legare un peptide lungo tra i 9 e gli 11 amminoacidi. È grazie a questa subunità che le molecole MHC di classe I legano gli antigeni processati nella cellula e, di conseguenza, possono presentarli ai linfociti T citotossici. Alcuni studi hanno dimostrato che il sito di legame è formato da

numerosi siti minori, che sono nicchie costituite da residui amminoacidici diversi, che si legano alla catena principale e/o a catene laterali del peptide (Matsumura et al., 1992).

- proteina extracellulare **β 2-microglobulina**: ha un peso di 12 KDa ed è codificata da un gene che troviamo sul cromosoma 15. La sua funzione principale sembrerebbe quella di conferire stabilità alla catena α delle molecole MHC tanto che, in caso di sua assenza, quest'ultima -la catena α - potrebbe perdere la capacità antigenica (Lancet et al., 1979). Altra funzione, altrettanto importante, è quella di controllare l'espressione degli antigeni HLA-A*, -B* e -C*.

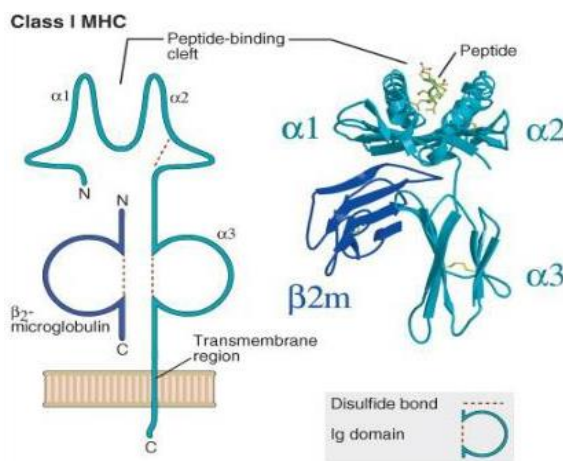


Figura n.4: molecola MHC di classe I

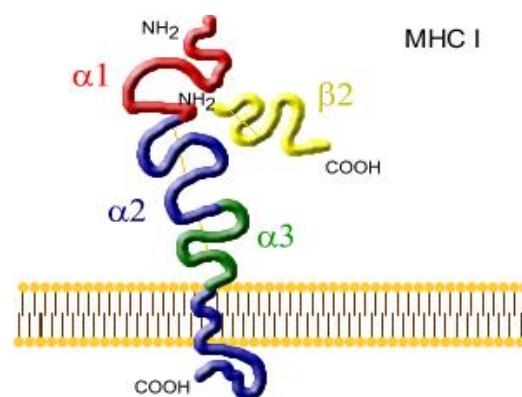


Figura n.5: HLA di classe I

1.2.2 Espressione degli antigeni di classe I

I geni che codificano gli antigeni di classe I sono **HLA-A***, **-B*** e **-C***. Questi -gli antigeni- li troviamo espressi su quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo umano, però, con differente "livello di espressione" tra le cellule. La massima espressività degli antigeni di classe I la troviamo a livello dei linfociti (dove rappresentano circa l'1% di tutte le proteine di membrana); abbiamo, invece, una bassa espressività a livello delle cellule somatiche; infine non abbiamo espressione, quindi non sono presenti, sulle cellule immature -come spermatogoni o eritrociti immaturi- (Klein et al., 2000; Carcassi¹ et al., 2001) o alcune cellule specializzate -come quelle del tubulo renale, epatociti, cellule di Kupfer-. Inoltre, l'espressione può essere indotta da numerosi immunomodulatori come **IFN α** , **β** e **γ** e il **TNF α** (Chang et al., 1986). L'espressione, invece, può essere soppressa dai virus o dall'azione di oncogeni, come nel caso dell'inibizione della trascrizione di HLA-B*, a causa dell'attivazione di **c-myc** (Peltenburg et al., 1994). Sulle piastrine non tutti gli antigeni sono espressi in maniera completa: entrando nello specifico, **B8**, **B12** e **B40** lo sono in forma ridotta. Sui globuli rossi, invece, sembra non ci sia

espressione di questi. In conclusione, gli antigeni di classe I hanno un ruolo anche a livello del sistema immunitario innato, poiché sono i ligandi dei recettori **KIR** (*Killer Immunoglobuline-like Receptor*) che sono presenti sulle cellule *Natural Killer* o **NK** alloreattive (Randi, 2011).



Figura n.6: organizzazione genica della regione HLA di classe I

1.2.3 Presentazione dell'antigene sulle molecole di classe I

Le molecole di classe I hanno il compito di presentare i peptidi di origine virale ai **linfociti CD8+**, i quali svolgono essenzialmente il ruolo di linfociti T-citotossici (la cui funzione principale è quella di uccidere la cellula che espone l'antigene virale).

La figura n.7 mostra, tappa per tappa, quello che succede nel momento in cui una cellula sana viene infettata da un virus.

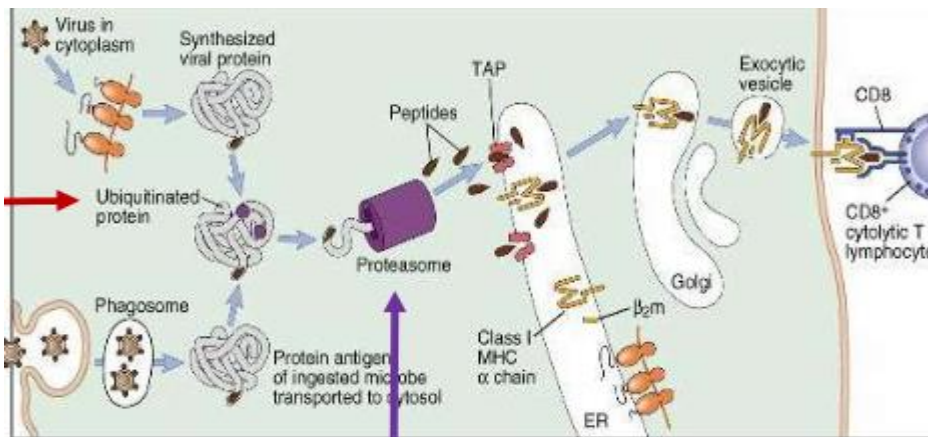


Figura n.7: presentazione dell'antigene sulla molecola HLA di classe I

Essenzialmente succede che le proteine anomale, prodotte all'interno della cellula infettata da un virus, o provenienti da una cellula neoplastica, vengono demolite nella cellula stessa. I frammenti che ne derivano si legano alle molecole HLA di classe I, e così vengono trasportate sulla superficie cellulare per essere presentate ai linfociti T citotossici CD8+ o ai linfociti *Natural Killer*. Questi riconoscono il peptide grazie all'azione del recettore specifico (**TCR**), si attivano e inducono la morte cellulare.

I domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$, come abbiamo visto nel paragrafo 1.2.1, delimitano quella cavità che va a formare la tasca, nella quale sono montati i peptidi antigenici per essere presentati al TCR dei linfociti T-citotossici. La conformazione della tasca è particolare in quanto le estremità si avvicinano molto, tanto da chiudere la tasca stessa; questo è responsabile del fatto che possono legarsi peptidi con lunghezza di massimo 10 amminoacidi.

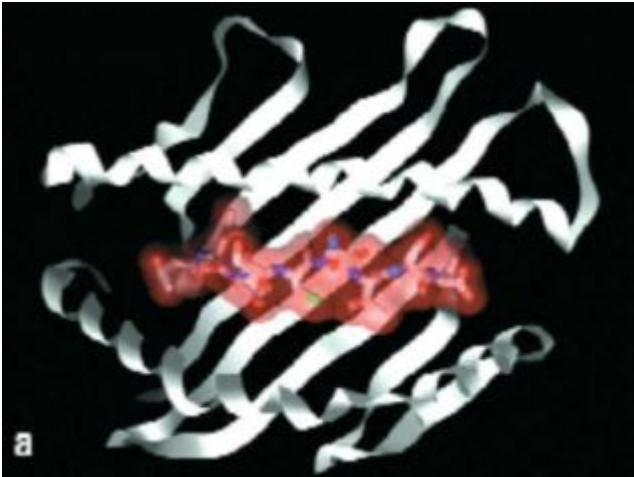


Figura n.8: struttura cristallografica della tasca che lega il peptide

Il dominio $\alpha 3$ è invece responsabile del legame con il co-recettore *CD8*, ed è per questo motivo che le molecole di classe I possono attivare solo e soltanto i linfociti *CD8+* citotossici o killer, che provocano la morte delle cellule che producono gli antigeni esogeni.

1.2.4 Le molecole HLA di classe II

Le molecole di classe II sono **eterodimeri** composti da due catene polipeptidiche glicosilate;

- **catena lunga** o **catena α** dal peso di 34 kDa;
- **catena corta** o **catena β** dal peso di 29 kDa.

Le due catene risultano legate in maniera **non covalente** e presentano un grado di glicosilazione diverso: la catena lunga presenta un grado maggiore rispetto a quella corta. Durante la loro formazione, le catene α e β neosintetizzate, vengono associate ad una specifica molecola, chiamata **IN** (*Invariant Chain*), che sembrerebbe guidare la molecola HLA neosintetizzata verso il compartimento endosomiale (che è deputato alla coniugazione dell'eterodimero con il peptide).

Strutturalmente parlando, possiamo individuare tre diverse zone a livello delle catene:

1. regione **extracellulare** idrofila (con una lunghezza di 180 aa);

2. regione **transmembrana** (con una lunghezza di 25 aa);
3. regione **intracellulare** idrofila (con lunghezza variabile).

Una importante differenza è che i geni che codificano per la catena lunga, o catena α , comprendono 5 esoni (di cui: uno codificante per la regione transmembrana, uno per la regione intracellulare, uno per il peptide segnale e due per le regioni extracellulari) mentre quelli che codificano per la catena corta, o catena β , comprendono 6 esoni (alcuni dei quali codificano per la regione intracellulare).

Altra differenza tra le due catene la troviamo a livello della componente glicidica: sulla catena α troviamo due radicali oligosaccaridici mentre sulla catena β troviamo invece un unico oligosaccaride (Kratzin et al., 1981).

La struttura finale che si viene a creare viene stabilizzata da dei legami disolfuro che si formano tra le catene (nello specifico uno si forma a livello della catena α e due a livello della catena β) e che codificano due domini su entrambe le molecole ($\alpha 1$ e $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$).

Di solito, in associazione con i dimeri, possiamo trovare anche una terza glicoproteina, detta **Ii**, che risulta essere particolarmente ricca di metionina e che viene codificata da un gene che troviamo a livello del cromosoma 5 (estraneo al complesso HLA) (Charron et al, 1979).

Sono state individuate tre famiglie di antigeni di classe II; abbiamo:

- **DR;**
- **DQ;**
- **DP.**

Ognuna di queste famiglie presenta poi una *subregione* costituita da un numero diverso di geni (sia per la catena α che per la catena β); in particolare:

- la **subregione DR** per la catena α contiene un gene invariato, per la catena β contiene un numero variabile di geni polimorfici (**DRB1, DRB2, DRB3, DRB4, DRB5, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9**) (Andersson et al., 1987);
- nella **subregione DQ** sono state individuate due catene α (**DQA1 e DQA2**) e tre catene β (**DQB1, DQB2 e DQB3**). È giusto sottolineare il fatto che sono espresse soltanto le catene DQA1 e DQB1 perché gli altri sono *pseudo-geni*;
- nella **subregione DP** troviamo due geni per la catena α (**DPA1 e DPA2**) e due per la catena β (**DPB1 e DPB2**). Anche in questo caso sono espresse soltanto le catene DPA1 e DPB1 perché DPA2 e DPB2 sono pseudo-geni.

In realtà, oltre le subregioni e gli pseudo-geni visti sopra, sono stati identificati numerosi altri geni e pseudo-geni, come **DM** e **DN** che sono geni HLA di classe II non classici, oppure geni che codificano per componenti del proteosoma o del sistema di trasporto dei peptidi dal citosol al reticolo endoplasmatico.

Di seguito, la figura n. 9, mostra l'organizzazione genica della regione HLA di classe II:

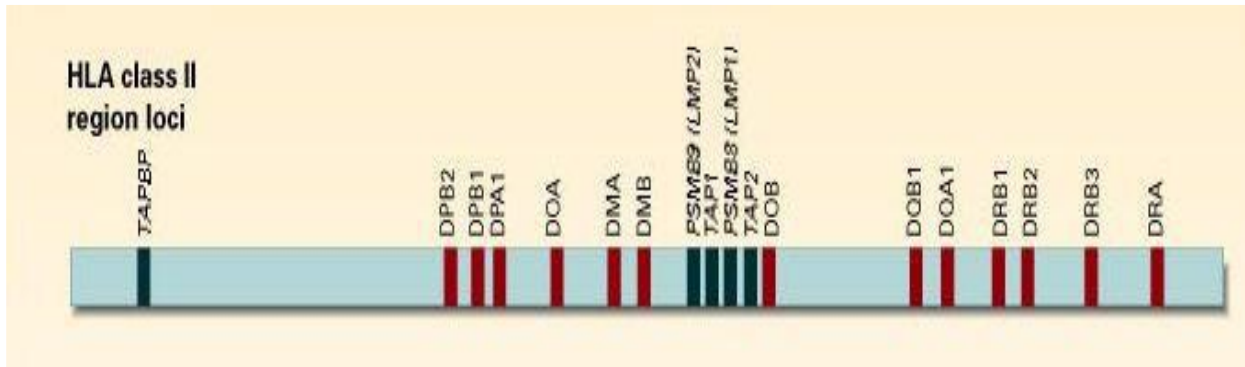


Figura n.9: organizzazione genica della regione HLA di classe II

1.2.5 Espressione degli antigeni di classe II

Vengono codificati dai geni **HLA-DP***, **-DQ*** e **-DR***. A differenza degli antigeni di classe I, quelli di classe II presentano una ristretta diffusione, poiché sono presenti soltanto su certe linee cellulari, quali:

- linfociti B;
- cellule dell'epitelio timico;
- macrofagi;
- cellule di Kupfer del fegato;
- cellule detritiche dei linfonodi;
- cellule del Langerhans;
- una certa quota di linfociti T: ne sono normalmente privi però per mezzo di attivazione naturale o di attivazione indotta artificialmente (mediante stimolazione con lectine), possono anche esprimerli.

Invece mancano completamente sui granulociti, sulle piastrine e sui fibroblasti.

L'espressione dei geni HLA di classe II può comunque essere indotta, nei vari tipi cellulari, attraverso l'uso, per fare un esempio, di fattori solubili, quali **interleuchina 4** (o **IL-4**) o **l'interferone- γ** (o **INF- γ**).

Un'alterata espressione degli antigeni di classe II è stata associata a numerose patologie (McGuire et al., 1994). Per esempio, nei fenomeni di rigetto, è stata osservata l'elevata espressione delle molecole HLA di classe II come diretta conseguenza di una produzione locale di interferone- γ . Un'errata espressione di queste molecole può essere osservata anche nelle cellule tumorali (Cabrera et al., 1995); per esempio, le cellule maligne dell'epitelio polmonare sono caratterizzate da un aumento dell'espressione di molecole DR, normalmente non espresse (Concha et al., 1995).

1.2.6 Presentazione dell'antigene sulle molecole di classe II

Si ha del materiale extracellulare (quindi batteri o tossine) che viene fagocitato da una cellula specializzata; una volta all'interno delle vescicole, viene frammentato in piccoli peptidi da parte di enzimi proteolitici, cioè viene trasformato per essere esposto sulla superficie della cellula **APC**, insieme alle molecole HLA di classe II. Nello specifico, le proteine HLA di classe II, presentano i peptidi di derivazione extracellulare ai linfociti **T-helper** o **CD4+**; quest'ultime, una volta attive, iniziano a proliferare e stimolano i linfociti B specifici per quell'antigene (che si differenzieranno a loro volta in plasmacellule alcune e cellule della memoria altre).

Come abbiamo visto nel paragrafo 1.2.4, anche nelle molecole di classe II troviamo una tasca che accoglie i peptidi per il legame; in questo caso, però, le due α eliche si mantengono più distanti, lasciando la tasca più aperta; è per questo motivo che la tasca delle molecole di classe II riesce ad accogliere peptidi di lunghezza maggiore.

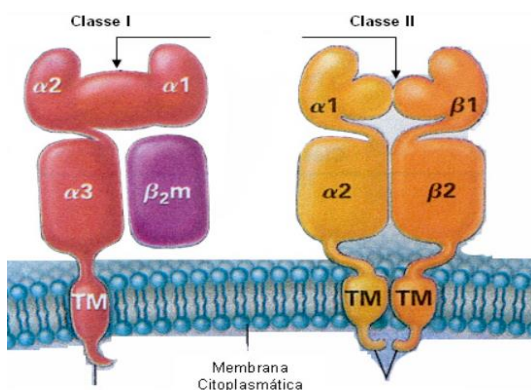


Figura n.10: confronto tra tasca molecole di classe I e di classe II

Il polimorfismo, infine, lo troviamo soprattutto nei domini $\alpha 1$ e $\beta 1$, mentre il dominio $\beta 2$ è quello non polimorfico e rappresenta il punto di contatto per il co-recettore CD4; per questo, possono attivare solo le cellule CD4+ o linfociti T-helper.

1.2.7 Le molecole HLA di classe III

Come abbiamo avuto modo di accennare in precedenza, la regione di classe III si trova nel mezzo tra la regione di classe I e quella di classe II; nello specifico, come possiamo notare dalla figura n.11, è locata tra i loci B e DR.

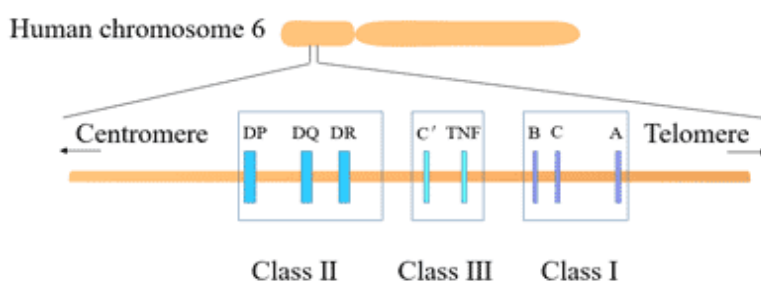


Figura n. 11: disposizione della regione di classe III rispetto a quelle di classe I e II

La regione di classe III contiene tanti geni responsabili della produzione di molecole solubili; abbiamo:

- geni che controllano tre componenti della cascata complementare, le cosiddette **proteine seriche**; nello specifico stiamo parlando dei fattori *B*, *C2* e *C4* conosciuti anche come "Prodotti di classe III";
- geni **TNF α e β** (Tumor Necrosis Factor) che codificano per una citochina coinvolta nella risposta immune;
- i geni **CYP21A**, che in realtà è uno pseudo-gene, e **CYP21B** che invece codifica per l'enzima 21-idrossilasi surrenalico o 21-OH, che risulta esser coinvolto nella via biosintetica del cortisolo, dell'aldosterone e del testosterone. La mutazione o la delezione genica potrebbe indurre deficit dell'enzima 21-idrossilasi surrenalico, causando il blocco metabolico della produzione degli ormoni citati prima e l'accumulo dei precursori metabolici portando; questo può indurre la comparsa di una patologia, nota con in nome di "*Iperplasia congenita surrenale*";

- geni **HSP70** codificano invece per alcune proteine dello stress termico, coinvolte soprattutto nel mantenimento delle funzioni cellulari, come folding, assemblaggio e trasporto dei peptidi intracellulari nella via di degradazione delle proteine.

1.2.8 Locus HLA-DPB1*

L'*antigene leucocitario umano* (HLA)-DP* è un antigene con il ruolo di mediare l'alloreattività, attraverso la diversità dell'epitopo delle cellule T (Ray Sajulga et al.; 2023). È stato descritto per la prima volta nel 1980 come un gruppo distinto di antigeni HLA di classe II, che ricava risposte variabili delle cellule T nelle reazioni linfocitarie miste. Da allora, diversi studi mostrano che le molecole HLA-DP* funzionano come elementi di restrizione per le cellule T, specifiche per gli antigeni virali e tumorali.

Dal punto di vista strutturale, questa molecola è un **eterodimero** costituito da due catene, entrambe ancorate alla membrana:

- **catena α** , cioè **DPA**;
- **catena β** , cioè **DPB**.

La catena β è di circa 26-28 kDa e il suo gene contiene *sei* esoni: l'esone *uno* codifica il peptide leader, gli esoni *due* e *tre* codificano i due domini extracellulari, l'esone *quattro* codifica il dominio transmembrana e l'esone *cinque* codifica la coda citoplasmatica. All'interno della molecola DP, sia la catena α che la catena β , contengono polimorfismi che specificano le specialità di legame del peptide; da questo ne derivano fino a quattro molecole diverse.

Il gene HLA-DPB1*, quindi, fornisce istruzioni per produrre una proteina che svolge un ruolo fondamentale nel sistema immunitario: la proteina prodotta dal gene, poi, si lega alla proteina prodotta da un altro gene MHC di classe II, cioè **HLA-DPA1*** ed insieme formano un complesso proteico funzionale chiamato **eterodimero DP $\alpha\beta$ legante l'antigene**. Questo complesso ha la funzione di mostrare i peptidi estranei al sistema immunitario: se quest'ultimo riconosce i peptidi (virali o batterici) come *non-self*, innesca una risposta per attaccare i virus o i batteri che hanno invaso la cellula.

Ciascun gene MHC di classe II presenta molte possibili variazioni, consentendo al sistema immunitario di reagire ad un'ampia gamma di invasori stranieri.

Nel tempo, i ricercatori hanno identificato molte varianti diverse di alleli del gene *HLA-DPB1**; vi è il **Comitato per la nomenclatura dei fattori del sistema HLA dell'OMS**

(<https://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>) che ha il compito di denominare i nuovi geni HLA. Per fare un esempio:

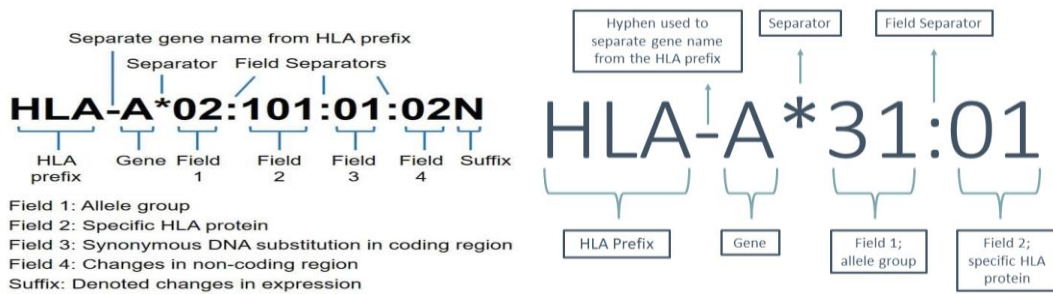


Figura n.13: nomenclatura

Il locus HLA-DPB1* si trova vicino al centromero del braccio corto del cromosoma 6, punto in cui la ricombinazione dà origine ad una variazione nell'aplotipo della prole.

Ci sono, tuttavia, alcuni geni HLA-DPB1* che codificano per delle molecole non classiche, come **HLA-G***, coinvolto nella protezione fecale, e **HLA-E***, coinvolto invece nelle risposte delle cellule *Natural Killer*.

Diverse osservazioni hanno sottolineato l'importanza dell'HLA-DPB1* sull'esito del trapianto: studi pre-trapianto di questo locus possono essere essenziali per determinare il successo o meno del trattamento. I mismatch HLA-DP* sono molto importanti, in quanto partecipano al rigetto cellulare e umorale dell'allotrapianto di CSE; gli eventuali rischi post-trapianto, possono essere quindi ridotti selezionando attentamente i donatori non correlati che corrispondono, però, per l'allele HLA-DPB1*.

La classificazione dei mismatch HLA-DPB1*, basata sui gruppi di *epitopi delle cellule T*, potrebbe identificare i mismatch permissivi (cioè quelli che potrebbero essere tollerati) e quelli non permissivi (cioè quelli che non verrebbero tollerati e che, di conseguenza, aumenterebbero i rischi di insorgenza di problemi post-trapianto).

I mismatch HLA-DPB1* permissivi sono associati a una alloreattività elicitata, che si traduce in un effetto benefico di **GVL** (*Graft Versus Leukemia*) e con **GvHD** clinicamente tollerabile; questo ha aumentato, in modo significativo, la probabilità di trovare donatori non consanguinei idonei e ha ridotto i rischi di mortalità, evitando donatori con mismatch non permissivi.

1.3 Tecniche di tipizzazione

Prima del trapianto viene effettuata la tipizzazione, per valutare la compatibilità tra paziente e donatore; questo ci permette di ridurre al minimo la possibilità che si verifichino le complicanze post-trapianto.

Per l'identificazione degli antigeni del sistema HLA, vengono utilizzate principalmente tecniche molecolari, che permettono una caratterizzazione più dettagliata e accurata.

1.3.1 Tecniche molecolari

Le tecniche molecolari consentono di individuare ed analizzare i diversi alleli HLA a livello genetico offrendo, inoltre, una maggiore risoluzione rispetto alle tecniche precedenti.

In laboratorio, per quanto riguarda lo studio fatto sul sistema HLA, vengono usate diverse tecniche, come:

- **PCR-SSP;**
- **PCR-SSO;**
- **PCR-SBT;**
- **NGS.**

Prima di conoscere nel dettaglio queste diverse metodologie, è giusto fare un piccolo rimando alla tecnica della PCR. La *Polymerase Chain Reaction* (*reazione a catena della polimerasi*) o, semplicemente **PCR**, è una tecnica di biologia molecolare che ci permette l'amplificazione (cioè la moltiplicazione) di frammenti di acidi nucleici, di cui conosciamo soltanto le sequenze nucleotidiche iniziali e finali. Questa tecnica ci permette di ottenere una quantità maggiore di materiale genetico, utile alle successive applicazioni. Nello specifico la PCR va a ricostruire, *in vitro* (sintesi), un segmento di DNA a doppia elica partendo da un filamento "guida" a singola elica, per mezzo dell'utilizzo di una serie di nucleotidi "mattoncini" disposti correttamente in base alla sequenza del filamento guida.

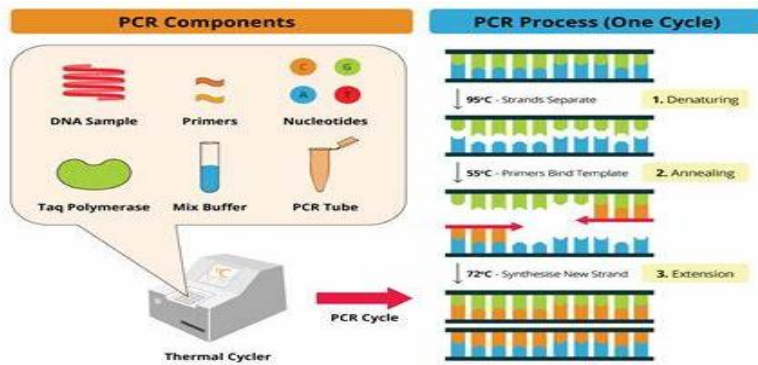


Figura n.14: schematizzazione delle fasi della PCR

Una volta fatta questa premessa, possiamo proseguire con le tecniche citate prima:

- **PCR-SSP** (*PCR- Sequence Specific Primers*) è una tra le più comuni metodiche utilizzate per la tipizzazione HLA; vengono usate coppie di primer allele-specifiche, per riuscire a risalire agli alleli presenti nel campione di DNA analizzato. In ogni reazione di PCR son presenti anche coppie di primers aspecifici, con la funzione di controllo interno positivo. Per l'acquisizione dell'immagine, alla fine di tutto, si effettua una migrazione elettroforetica del DNA su gel di agarosio e successiva lettura allo spettrofotometro;
- **PCR-SSO** (*PCR- Specific Oligonucleotide Probe*) metodica che utilizza le sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche che, appunto, vanno a legarsi in modo specifico alle sequenze di interesse all'interno dei geni HLA amplificati; grazie alle sonde marcate riusciamo a rilevare le sequenze HLA specifiche;
- **PCR-SBT** (*PCR- Sequence Based Typing*) metodica che permette sia di individuare la presenza di nuovi alleli e sia di determinare il genotipo HLA tramite sequenziamento diretto del prodotto di PCR di ogni *locus* (Carcassi²,2001);
- **NGS** (*Next Generation Sequencing*) è una tecnica avanzata utilizzata per sequenziare rapidamente, e in modo efficiente, regioni specifiche dei geni HLA. Questo metodo fornisce maggiori dettagli sulle varianti HLA rispetto ai metodi tradizionali.

1.4 Cellule staminali emopoietiche

Le **cellule staminali emopoietiche** o **CSE** sono la base del sistema ematopoietico adulto, in quanto importanti sia del mantenimento a lungo termine che della produzione delle cellule del sangue, durante l'intera vita di un organismo (Elaine Dzierzak, Anna Bigas; 2018). Le troviamo sia a livello del midollo osseo (1-3%) che nel sangue periferico (0,1-0,01%). Le caratteristiche che contraddistinguono questo tipo di cellule sono:

- capacità di rinnovarsi mantenendosi allo stato indifferenziato;
- capacità di differenziarsi in un gran numero di tipi cellulari differenti.

Tali caratteristiche dipendono dalla loro particolare procedura di riproduzione. Ricordiamo che le cellule adulte e già specializzate si dividono in modo **simmetrico**: le due cellule figlie che ne derivano, sono copie esatte della cellula madre. Le cellule staminali, invece, si dividono in maniera **asimmetrica**, portando alla formazione sia di una cellula CSE identica alla cellula madre (che conserva tutte le caratteristiche di cellula staminale), sia di una **cellula progenitrice**, parzialmente differenziata e incapace di autorinnovamento ma dotata di ampio potenziale replicativo.

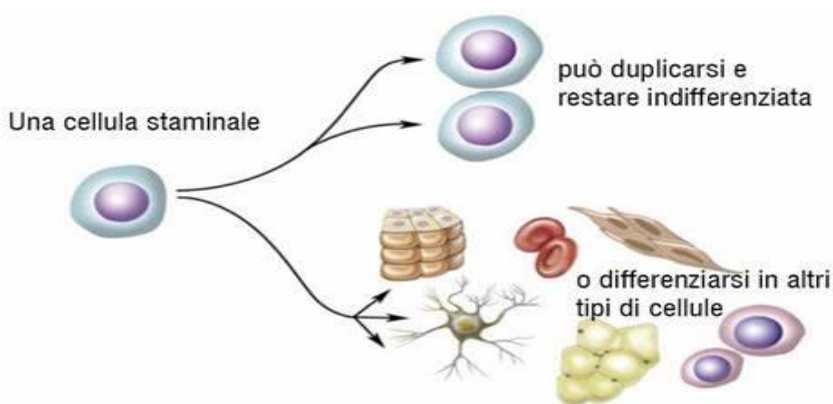


Figura n.15: divisione CSE

Inoltre, il tipo di differenziamento a cui va incontro la cellula progenitrice, induce la distinzione delle cellule del sangue in due linee:

- **linea mieloide** e cioè derivate da un progenitore mieloide, comprende: **monociti, granulociti, basofili ed eosinofili, eritrociti, cellule dendritiche e megacariociti**;
- **linea linfoide** e cioè derivate da un progenitore linfoide, comprende: **linfociti T, linfociti B, cellule NK**.

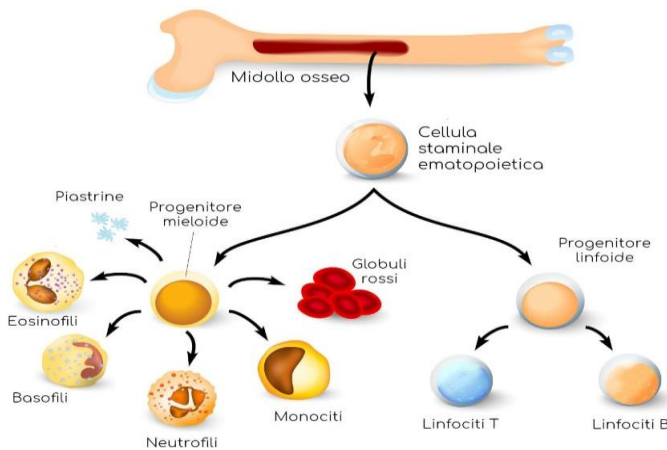


Figura n.16: schema linea linfoide e mieloide

Le cellule staminali emopoietiche possiedono capacità di **automantenimento** e di **differenziazione** verso la produzione di cellule “committed” (**orientate**) allo sviluppo di una o più linee cellulari mature. Tali funzioni vengono svolte da sottotipi cellulari che, pur non distinguibili morfologicamente, sono comunque dotati di attività proliferativa e differenziativa diverse:

- cellule staminali totipotenti che hanno bassa attività proliferativa ma sono capaci di differenziarsi in qualsiasi tipo di tessuto. Possono quindi dare origine ad un intero organismo e persino a tessuti embrionali. Sono cellule deputate essenzialmente al mantenimento;
- cellule staminali “committed” che, invece, presentano elevato potere proliferativo (Ogawa, 1993);
- cellule unipotenti che possono dare vita solo ad uno specifico tessuto (De Coppi, 2002).

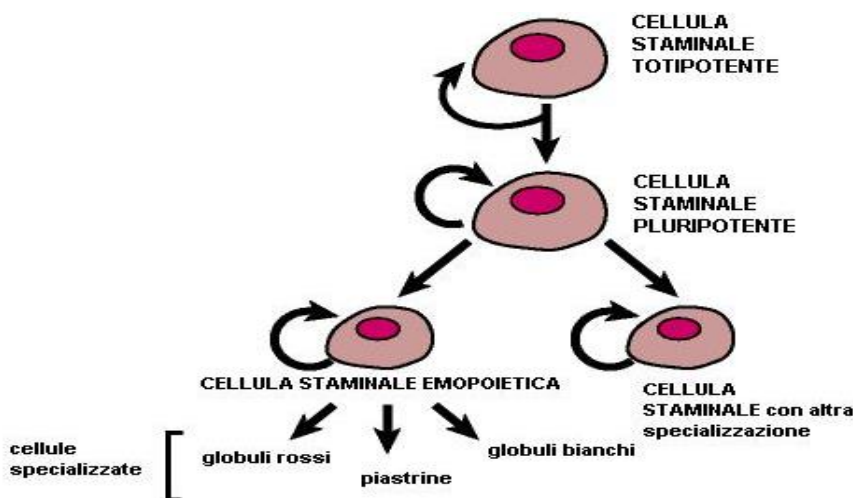


Figura n.17: gerarchia cellule staminali

Nell'uomo, le cellule staminali del sistema emopoietico appaiono per la prima volta nel sacco vitellino (Elaine Dzierzak, Anna Bigas; 2018) a partire dalla terza settimana di gestazione. Dalla quarta settimana, invece, il compito di produrre tali cellule passa al fegato e, infine, al midollo osseo. Nell'adulto, quindi, troviamo le CSE a livello del midollo osseo, che diviene principale sito **dell'emopoiesi**.



Figura n.18: il midollo osseo

Il midollo osseo è di consistenza **gelatinosa e semifluida** ed occupa soprattutto le cavità interne delle ossa. Lo troviamo nelle **diafisi** delle ossa lunghe e nelle **epifisi** delle ossa lunghe o delle ossa piatte.

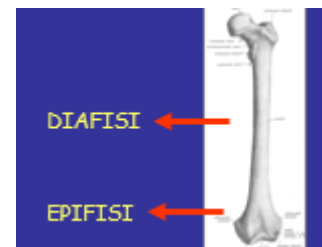


Figura n.19: diafisi ed epifisi

1.5 Trapianto di cellule staminali emopoietiche

Il *trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT)* è un trattamento molto efficace che consiste nell'infondere le cellule progenitrici del sistema ematopoietico per il trattamento sia di **patologie ematologiche**, come: *aplasia midollare, leucemia mieloide cronica, linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, leucemie acute linfoidi e mieloidi, mieloma multiplo e mielodisplasia*, ma anche di **patologie congenite non ematologiche**, come: *disordini lisosomiali e non lisosomiali, talassemia major, immunodeficienze primitive, anemie falciforme*.

1.5.1 Fonti delle cellule staminali

Le fonti di CSE sono:

- **midollo osseo** (1-3%): in questo caso la raccolta si esegue tramite delle biopsie ossee a livello delle ossa pelviche del donatore, in corrispondenza delle spine iliache posteriori. Per prelevare le CSE dal midollo osseo, il donatore subisce una anestesia generale; gli eventi avversi che si possono verificare durante la donazione sono soprattutto: dolore al sito di raccolta, mal di schiena, nausea, stanchezza generale (Confer et al., 2007; Siddiq 2009).

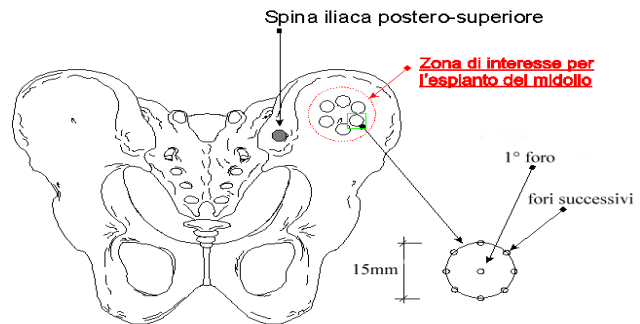


Figura n.20: sito iniezione per donazione

Il midollo osseo viene scelto come fonte di CSE nelle condizioni che non richiedono reazioni di trapianto contro la leucemia, a causa dell'incidenza di GvHD in apparenza più bassa (Bensinger WI., 2012).

- **sangue periferico** (0,01-0,1%): a partire dagli anni '90, le cellule staminali dal sangue periferico, mobilizzate con il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (**G-CSF**), sono state utilizzate sempre di più, arrivando a sostituire il midollo osseo come fonte principale di CSE. Il trapianto di cellule staminali provenienti da sangue periferico, rispetto quelle raccolte dal midollo osseo, è associato ad un attecchimento più rapido di globuli rossi, piastrine e neutrofilo ed incidenza di infezione più bassa (Stem Cell Trialists' Collaborative Group 2005; Stem Cell Trialists' Collaborative Group 2006).
- **sangue placentare** (0,1-0,4%): vengono raccolte dai cordoni ombelicali subito dopo il parto. Vengono però impiegate poco in ambito di trapianti a causa del ridotto numero di cellule che possiamo ottenere da questa fonte; il loro utilizzo si limita essenzialmente a pazienti con basso peso corporeo e ai pazienti pediatrici (Gluckman E. et al., 2006).

1.5.2 Tipologie di trapianto: allogenico e autologo

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche si divide in:

1) trapianto allogenico: l'obiettivo è quello di sostituire le cellule alterate del paziente, attraverso l'infusione del patrimonio di cellule staminali ottenuto da un donatore. Si tratta di una modalità di trattamento importante poiché potenzialmente curativa per diverse patologie ematologiche maligne come *linfomi*, *mieloma multiplo (MM)* e *leucemie acute o croniche, recidivate e refrattarie* (Appelbaum FR., 2007). Prima del trapianto, il paziente viene sottoposto a un regime di condizionamento, costituito da chemioterapia e/o radioterapia. Successivamente, al fine di sostituire il proprio sistema ematopoietico, riceve le cellule staminali, che possono derivare sia da un donatore imparentato che da un donatore non correlato. Per evitare possibili complicanze, quali rigetto del trapianto o GvHD, i donatori (sia correlati che non) vengono scelti in base a *loci* definiti dall'HLA di classe I e II (Petersdorf E. et al., 2001).



Figura n.21: percorso trapianto allogenico

Il buon esito del trapianto allogenico dipende essenzialmente dalla realizzazione di tre fattori principali:

1. scomparsa totale delle cellule staminali del ricevente ottenuto grazie ad un adatto regime di condizionamento; questo serve a “creare spazio” alle cellule del donatore, eliminando il più possibile il midollo del paziente (Elmaagacli et al., 1996);
2. buon superamento degli effetti tossici dovuti al regime di condizionamento stesso (a causa dell'alto dosaggio dei farmaci impiegati) poiché può provocare danni a vari organi o può abbattere le difese immunitarie del paziente, esponendolo a rischi quali infezioni;
3. superamento della cosiddetta “doppia barriera immunologica”: dal ricevente al donatore -**rigetto**- e dal donatore al ricevente -**GvHD**- (Arata, 2009).

Di conseguenza, si evince che la guarigione del paziente dipende sia dalla reale scomparsa delle sue cellule midollari, ottenuta con il regime di condizionamento, che dalla loro sostituzione con le cellule staminali emopoietiche del donatore (Formankova et al., 2000). Le cellule staminali emopoietiche, utilizzate nel trapianto allogenico, si ottengono per donazione da sangue periferico (in *aferesi*) oppure attraverso donazione da midollo osseo. Queste, poi, possono essere prelevate da:

- donatore familiare HLA compatibile;
- da donatore HLA aploidentico, che coinvolge un parente che ha in comune, col paziente, almeno uno dei due cromosomi su cui sono codificati i geni di istocompatibilità (aplotipo). Sono sempre aploidentici i genitori e i figli, mentre è alta la probabilità che lo siano anche i fratelli. Si possono trovare donatori aploidentici anche in parenti più lontani; per questo la percentuale di pazienti con almeno un donatore familiare aploidentico è superiore all'80% (HSR, 2010);
- da donatore familiare HLA parzialmente compatibile;
- da donatore non familiare HLA compatibile;
- da donatore non familiare HLA parzialmente compatibile.



Figura n.22: i diversi donatori nel trapianto allogenico

Il trapianto allogenico viene scelto per il trattamento di disturbi ematologici, immunologici e metabolici maligni e benigni (Katharina Fleischhauer¹ et al.,2023).

In questa tipologia di trapianto, infine, il donatore può essere sia **consanguineo** che non **consanguineo**:

- donatore **consanguineo**: appartiene al nucleo familiare del ricevente. Molto spesso la ricerca si ferma al fratello del paziente in quanto, ricordiamo, la probabilità che i due siano compatibili è di circa il 50% (HSR, 2010). Il problema nasce nel momento in cui o non si riesce a trovare un fratello *genotipicamente* identico oppure quando il paziente è

figlio unico; in questo caso, sia l'indagine che la tipizzazione, si estende alla progenie del paziente (quindi zii, nonni, cugini, nipoti) per riuscire ad individuare, tra i parenti, un donatore che sia *fenotipicamente* identico al ricevente. Per la ricerca del donatore consanguineo si procede con la tipizzazione degli alleli *HLA-A**, *-B**, *-C**, *-DRB1**, *-DQB1** e *-DPB1** attraverso delle metodiche di biologia molecolare ad alta risoluzione. La scelta finale, naturalmente, tiene conto anche di altre caratteristiche legate al donatore, quali età, sesso, peso, caratteristiche ABO e *Cytomegalovirus (CMV)*. La probabilità di riuscire a trovare un donatore HLA-compatibile a livello familiare è del 30%; se, nonostante la ricerca, non si trova il donatore tra i membri della famiglia, si passa alla ricerca del donatore non consanguineo;

- donatore **non consanguineo**: si tratta di un donatore non imparentato col paziente (chiamati **MUD**, dall'inglese *Matched Unrelated Donor*). A favore di ciò in Italia, nel 1989, nacque il *Registro nazionale Italiano di Midollo Osseo* (noto internazionalmente con la sigla **IBMDR**, <https://ibmdr.galliera.it/>) con lo scopo di procurare, ai pazienti ematologici, il perfetto donatore tra i tanti volontari iscritti al registro. L'obiettivo, quindi, è trovare un donatore con caratteristiche immunogenetiche tali da consentire, con elevate probabilità di successo, il trapianto; il volontario mette a disposizione cellule staminali ematopoietiche in maniera del tutto anonima e non retribuita. Il progetto nacque con la consapevolezza che il trapianto di cellule staminali ematopoietiche sia una forma di trattamento potenzialmente curativa per molte malattie del sangue.

Il paziente può accedere alla ricerca presso l'*IBMDR* se la sua patologia e i relativi parametri rientrano nei "criteri di eleggibilità al trapianto di midollo osseo (*TMO*) da non consanguineo". Inoltre, nel momento in cui la ricerca del donatore non consanguineo si attiva, il paziente deve esser già tipizzato per HLA di classe I e II, con tecniche molecolari ad alta risoluzione. Data l'elevata richiesta di pazienti che necessitano del *TMO* e data la difficoltà nel trovare un donatore non correlato totalmente compatibile, i ricercatori man mano hanno preso in considerazione la possibilità di effettuare questo tipo di terapia anche quando la compatibilità fra donatore e ricevente non è totale.

Ad oggi il registro conta 498.734 potenziali donatori.

Tra gli eventi post trapianto che si possono verificare abbiamo soprattutto la **GvHD acuta e cronica**, che rappresenta una tra le principali cause di morbidità e mortalità correlate al trapianto allogenico, ma anche la tossicità del regime di condizionamento, il **rigetto** del trapianto o le infezioni (Jenq, 2010; Pollack2009).

2) trapianto autologo: nel trapianto autologo, definito anche **autotrapianto**, le cellule utili alla terapia, vengono prelevate direttamente dal paziente in un determinato momento del suo percorso terapeutico e poi crioconservate sino al momento della re-infusione. La procedura di raccolta viene detta **afèresi** e consiste in un prelievo, effettuato dalle vene del braccio o da un catetere venoso. Successivamente il sangue viene centrifugato per separare, quindi raccogliere, le sole cellule staminali, che verranno poi congelate e trasfuse al paziente una volta pronto alla rinfusione. Essenzialmente i passaggi sono:

1. vengono prelevate le cellule staminali dal paziente stesso;
2. il paziente subisce un periodo di chemioterapia e/o radioterapia ad alte dosi;
3. le cellule vengono scongelate (seguendo tutte le linee guida) e reinfuse al paziente.

Di solito, dopo l'infusione delle cellule, segue un periodo di *aplasia* (dalla durata di 10-15 gg), durante il quale le cellule staminali re-infuse ritornano nella loro sede naturale, dove proliferano e ricostituiscono il midollo normale; la rinfusione delle cellule staminali emopoietiche è in grado di rigenerare il midollo osseo

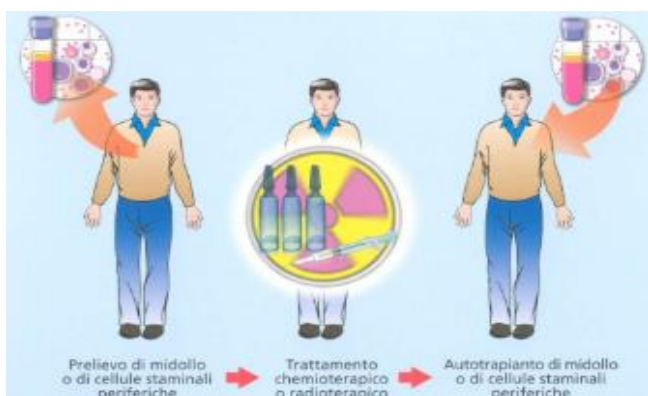


Figura n.23: percorso trapianto autologo

Dato che, a differenza di ciò che abbiamo visto con il trapianto allogenico, in questo caso il donatore ed il ricevente sono la stessa persona, questo annulla completamente rischi dovuti alla non-compatibilità tra donatore e ricevente (GvHD, rigetto, etc.). Viene usato per la cura di malattie del sangue (come la leucemia), malattie a livello del sistema immunitario, malattie a livello della cornea.

1.5.3 Il trapianto aploidentico

Il trapianto di cellule staminali **aploidentico**, conosciuto anche con l'acronimo **Haplo-SCT**, è una procedura potenzialmente curativa, utile soprattutto per molte malattie ematologiche ad alto rischio (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020), tanto che il trapianto aploidentico ha subito una notevole crescita in tutto il mondo (Piyanch Kongtim, Stefan O. Ciurrea, 2019).

Gli alleli HLA non segregano come caratteri indipendenti ma, in accordo con la prima legge di Mendel, segregano come se fosse un unico blocco d'informazione; questo dipende anche dal fatto che i *loci* HLA di classe I, II e III si trovano posizionati molto vicini sul cromosoma 6 (come possiamo notare dalle varie figure proposte in precedenza). Questo blocco viene chiamato **plotipo** e consente ad ogni individuo di possedere, nel proprio patrimonio genetico, due coppie di geni di ciascun *locus* HLA, uno di derivazione **materna** ed uno di derivazione **paterna**.

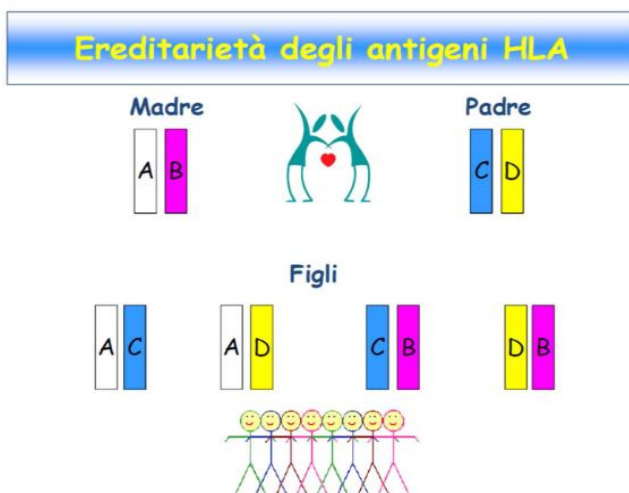


Figura n.24: ereditarietà degli antigeni HLA

In questa procedura, le cellule staminali da trapiantare provengono da un donatore in parte compatibile con il ricevente; si trapiantano, quindi, cellule staminali che per metà corrispondono a quelle del paziente: genitori, figli e fratelli sono potenziali donatori aploidentici. L'uso di donatori aploidentici rappresenta un forte vantaggio per la disponibilità, quasi universale e immediata, di cellule staminali per il trapianto.

Ne deriva che, uno dei vantaggi che si porta dietro questo tipo di trattamento, sicuramente è la tempistica più rapida, in quanto quasi tutti i pazienti ematologici hanno, tra i propri familiari, un donatore identico a metà.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi che suggeriscono come il trapianto aploidentico rappresenti un'opzione favorevole rispetto ai trapianti da donatori *MUD*, in

quanto promette esiti migliori in termini di sopravvivenza globale, a seguito di un ridotto rischio di mortalità senza recidiva. Questo tipo di trapianto, poi, ha registrato una notevole espansione in tutto il mondo, grazie allo sviluppo di diversi metodi innovativi, come i metodi multipli di *deplezione delle cellule T*, l'uso di *ciclofosfamide ad alte dosi post-trapianto (PT-Cy)* o il protocollo basato su *G-CSF e globulina anti-timociti (ATG)*, utili al superamento della disparità dell'*antigene leucocitario umano (HLA)* tra donatore e ricevente, che rappresenta una delle principali cause di ritardata ricostituzione immunitaria, fallimento del trapianto e grave malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD); diversi studi hanno dimostrato risultati equivalenti rispetto al trapianto da donatore HLA-match (Piyanch Kongtim, Stefan O. Ciurea, 2019).

Nello specifico, troviamo degli studi recenti che hanno portato alla luce che il trapianto di CSE aploidentiche, unito all'utilizzo della *ciclofosfamide* post-trapianto sia la migliore opzione terapeutica, tra quelle emergenti, per i pazienti con *linfoma* avanzato recidivante o refrattario. L'utilizzo del *PT-Cy* come profilassi della GvHD ne ha significativamente ridotto l'incidenza post-trapianto aploidentico rispetto al trapianto da donatore non correlato (Piyanch Kongtim, Stefan O. Ciurea, 2019). In uno studio storico risalente al 1965, George Santos aveva dimostrato, su modello animale, che l'utilizzo di PT-Cy ad alte dosi era capace di prevenire la GvHD da trapianti (G. W. Santos, A. H. Owens Jr, 1965); questo studio ha aperto le porte alla sperimentazione *in vivo* di tale agente farmacologico, anche perché si era finalmente riusciti nell'obbiettivo di superare la barriera HLA grazie all'utilizzo di un farmaco di facile impiego (A. Bacigalupo, 2008). Un aspetto caratteristico ed importante legato alla ciclofosfamide risiede nella sua capacità selettiva: il farmaco colpisce ed uccide le cellule T alloreattive del donatore ma lascia intatto il rimanente repertorio di cellule T; si tratta quindi di "*deplezione selettiva in vivo delle cellule T*" (A. Bacigalupo, 2008).

Ad oggi, quindi, è un farmaco di largo utilizzo, soprattutto nei trapianti aploidentici, rendendo questo tipo di trattamento al pari con i trapianti HLA correlati (A. Bacigalupo, 2008); questo amplia l'applicabilità dell'allo-trapianto anche ai pazienti che non dispongono di donatori correlati o MUD idonei (R. Mohty et al., 2024).

Quindi, l'agente farmacologico ciclofosfamide viene molto spesso utilizzato, *in vivo*, nel trapianto aploidentico di cellule staminali ematopoietiche in quanto aiuta a ridurre l'incidenza di Graft versus Host Disease (GvHD).

1.6 Ruolo dell'HLA sull'esito del trapianto

A livello laboratoristico, dopo il trattamento, si tiene in considerazione anche tutto ciò che succede nel post-trapianto. Possiamo valutare l'impatto della compatibilità HLA sull'esito del trapianto analizzando: il *rigetto*, l'incidenza e la severità della *GvHD* e la *sopravvivenza*.

1.6.1 Rigetto

Il rigetto, fenomeno controllato geneticamente, è una delle possibili complicanze che si possono verificare dopo trapianto allogenico, ed è dovuto all'attivazione del sistema immunitario del paziente che riconosce come estranee le proteine HLA del donatore. Le variabili che incrementano il rischio di rigetto includono: la patologia di base del paziente, l'intensità del regime di condizionamento, il grado di compatibilità con il donatore e la dose di cellule staminali trapiantate (Sacchi¹ et al., 2001). Il regime di condizionamento, fatto prima del trapianto, serve proprio ad eliminare le cellule del paziente in modo che queste, dopo il trattamento, non si attivino contro le nuove cellule trapiantate.

Abbiamo citato varie volte il regime di condizionamento; questo non è altro che il trattamento, pre-trapianto, dove il paziente subisce radioterapia e/o chemioterapia, utile come preparazione al trapianto. Lo scopo del regime di condizionamento è duplice:

- 1) distruggere tutte le cellule neoplastiche -o comunque la maggior parte- presenti nel paziente;
- 2) eradicare il sistema immunitario del paziente per consentire l'attecchimento delle nuove cellule emopoietiche e del nuovo sistema immunitario.

Di norma, l'infusione delle CSE viene effettuata dopo 24-48 ore dal condizionamento; non è da escludere la tossicità dovuta ai regimi usati, che può verificarsi entro i primi 15 giorni, coinvolgendo qualsiasi organo. Inoltre, il condizionamento comporta una fase di *aplasia*, nella quale si verifica abbassamento del valore dei globuli bianchi, delle piastrine e dell'emoglobina e, quindi, conseguente esposizione ad un elevato rischio di infezioni e di emorragie, che possono essere anche fatali. L'aplasia midollare termina quando le CSE infuse, proliferando, maturano e si differenziano in globuli bianchi, piastrine e globuli rossi.

Tecnicamente il rigetto può manifestarsi in diversi momenti dopo il trapianto; in base a ciò possiamo distinguere:

- rigetto **iperacuto** che compare dopo poche ore dal trapianto;

- rigetto **acuto** che compare nei primi 30 gg come mancato attecchimento del trapianto come sviluppo di pancitopenia e aplasia midollare;
- rigetto **cronico** che si manifesta anche dopo anni come perdita dell'attecchimento.

1.6.2 GvHD

La **GvHD** (dall'inglese *Graft versus Host Disease*) o *malattia da reazione del trapianto verso l'ospite* è una forma particolare di rigetto, in cui le cellule del sistema immunitario del donatore attaccano gli organi e i tessuti del ricevente poiché vengono riconosciuti come corpi estranei; rappresenta una delle principali cause di insuccesso del trapianto allogenico che può portare, nei peggiori casi, alla morte del paziente. Sicuramente i principali protagonisti della GvHD sono le cellule T del donatore, ma anche le citochine hanno la loro importanza nel danno agli organi *target* (Dickinson AM., 2007).

Comunemente, la reazione immunitaria che causa GvHD ha come bersagli:

- epitelio duttale biliare;
- cellule staminali ematopoietiche midollari;
- strato basale dell'epidermide e della mucosa gastrointestinale;
- epitelio ghiandolare esocrino (HRS, 2010).

Attraverso il trapianto di cellule staminali emopoietiche, nel paziente viene introdotto anche il sistema immunitario del donatore; ciò porta alla "convivenza" nello stesso organismo -quello del paziente-, sia del sistema immunitario del ricevente che quello del donatore. Ne consegue una peculiare situazione di competizione tra i due sistemi immunitari; nel peggiore dei casi si può assistere ad una reazione dell'organo immunocompetente del ricevente verso il tessuto trapiantato e una reazione dell'organo immunocompetente trapiantato nei confronti dei tessuti del ricevente (HSR, 2010).

Dobbiamo considerare la GvHD come conseguenza ad un esteso danno al sistema immunitario, dovuto ad una eccessiva terapia di condizionamento (che, come ricordiamo, è fondamentale per ridurre il rischio di rigetto del trapianto). Negli ultimi anni sono state promosse delle strategie per cercare di ridurre la tossicità di queste procedure terapeutiche, come l'impiego della terapia genica, utile al controllo delle complicanze legate al trapianto, oppure l'utilizzo di condizionamenti a ridotta tossicità che, pur avendo una notevole attività antileucemica, mantengono un livello di tossicità ridotta.

Clinicamente parlando, è possibile distinguere due diversi “tipi” di GvHD:

1) GvHDa o GvHD acuta: si verifica entro i 100 giorni dal trapianto (Glucksberg 1974). Si tratta, probabilmente, della conseguenza del riconoscimento degli allo-antigeni dell'ospite da parte dei linfociti T trapiantati. Molto spesso, quando si parla di GvHD acuta, si fa riferimento alla sua fisiopatologia, che comprende tre diverse fasi:

- durante la prima fase, il condizionamento induce nell'ospite danni a livello tissutale e ciò comporta sia la formazione di un ambiente pro-infiammatorio che l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene;
- nella seconda fase le cellule T del donatore vengono attivate da citochine stimolanti, in risposta alle cellule presentanti l'antigene;
- nella terza fase le cellule T citotossiche, insieme alle citochine infiammatorie, causano ulteriori danni (Ferrera 2009; Paczesny 2009).

La GvHDa colpisce principalmente in fegato, l'intestino e la pelle. Si è visto che i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore non correlato HLA-mismatched, hanno una probabilità più alta di avere maggiore incidenza di GvHD acuta. Parlando di percentuali, è stato riscontrato che circa il 40% dei trapiantati vada incontro a GvHD acuta dopo allo-HSCT; tale percentuale può variare dal 10 all'80% a seconda dei fattori di rischio considerati, anche se comunque la mortalità causata da infezioni o tossicità è diminuita negli ultimi 15 anni (Gratwohl, 2007).

2) GvHDc o GvHD cronica: si verifica dopo circa 100 giorni dal trapianto, anche se la sua fisiopatologia è poco conosciuta; si pensa che le cellule T e B allo-reattive, insieme alla formazione di anticorpi, causino l'infiammazione cronica dei tessuti. Viene considerata la principale causa di morbidità tardiva e della mortalità, senza recidiva, nei pazienti sopravvissuti al trapianto. Le caratteristiche cliniche che si verificano includono: alterazioni della pelle, degli occhi e della bocca e i sintomi che ne possono derivare assomigliano a quelli che caratterizzano le malattie autoimmuni multisistemiche, come *sindrome di Sjögren* o *Sclerosi Sistemica*. In base al numero di organi coinvolti ed in base alla gravità delle manifestazioni d'organo, la GvHD cronica viene classificata in malattia **lieve, moderata** o **grave** (Filipovich, 2005); la GvHD cronica lieve è legata all'aumento della sopravvivenza libera da recidiva a lungo termine (Ferrera 2009). Parlando di percentuali, è stato riscontrato che il 50% dei riceventi di HSCT sviluppa la GvHD

cronica, tale percentuale può variare dal 30 all'80% a seconda dei fattori di rischio che andiamo a considerare (Horwitz 2006).

1.6.3 Sopravvivenza

La sopravvivenza rappresenta la probabilità che un paziente sopravviva, dopo aver ricevuto un trapianto di un organo, tessuto o di cellule. È un concetto importante poiché riflette l'efficacia del trapianto nell'offrire al paziente una migliore qualità e aspettativa di vita. Studi hanno dimostrato che all'aumentare del numero di differenze negli HLA, diminuisce sensibilmente la probabilità di sopravvivenza; pazienti trapiantati da un consanguineo, con al massimo una differenza nelle caratteristiche HLA, hanno una probabilità di sopravvivenza più elevata rispetto ai pazienti trapiantati da donatore non consanguineo che, invece, presentano una maggiore incidenza di GvHD.

Una migliore profilassi delle infezioni da CMV e una completa identità a livello fenotipico per le caratteristiche HLA-A*, B* e DRB1*, si associano ad un'aumentata sopravvivenza (Petersdorf E. et al, 2001).

Mismatch multipli per le caratteristiche HLA di classe I o sia in classe I che II, correlavano con un'elevata mortalità; al contrario, una singola differenza o in classe I o in classe II sembrava non causare una diminuzione della sopravvivenza (Sacchi² et al.,2001).

1.7 Permissività del *locus* DPB1

L'allo-HSCT è una procedura terapeutica potenzialmente curativa per molte malattie ematologiche ad alto rischio (Adhikari J et al, 2017). La buona riuscita del trapianto dipende fortemente dal grado di compatibilità dei *loci* HLA tra donatore e ricevente; un trapianto scarsamente compatibile aumenta sia il rischio di scatenare GvHD, sia la mortalità (Shaw BE¹ et al, 2003). Sicuramente gli accoppiamenti HLA-A*, -B*, -C*, -DRB1* e -DQB1* (10/10) sono ottimali per il trapianto di CSE, ma alcuni studi suggeriscono che sia necessaria un'analisi più approfondita del *locus* HLA-DPB1* a causa della sua importanza numerica; fino ad oggi sono stati descritti oltre 1000 alleli (Robinson J. et al, 2015). Il *locus* HLA-DPB1* sappiamo essere altamente polimorfico e ciò significa che, anche una minima differenza (persino di un singolo amminoacido), può portare allo scatenarsi di reazioni alloimmuni anche molto severe.

Il *locus* HLA-DPB1* si trova vicino al braccio corto del cromosoma 6 (Shaw BE². et al, 2010); la ricombinazione, in questo punto specifico, può dare origine ad una variazione nell'aplotipo della progenie (Aversa F. et al, 1998). Degli studi hanno infatti mostrato che, in donatori fratelli appaiati per HLA-A*, -B* e -DR*, la percentuale di mismatch HLA-DPB1* è circa del 5%, a causa proprio della ricombinazione (Büchler T. et al, 2002); per la presenza di questo mismatching possono essere riscontrate diverse complicazioni (Shaw BE³. et al, 2006). Perciò è importante effettuare uno studio pre-trapianto approfondito a livello del *locus* DPB1* nel trattamento aploidentico, per confermare o meno se, l'intero blocco aploidentico venga trasmesso come un'unità (Aversa F. et al, 1998). Possiamo quindi affermare che i mismatch HLA-DP* sono importanti, in quanto diversi studi affermano che partecipano al rigetto cellulare e umorale nel trapianto allogenico (Katharina Fleischhauer². et al, 2017).

A favore di ciò, prima di procedere con un trapianto aploidentico di CSE, viene valutata la permissività del mismatch al *locus* HLA-DPB1* attraverso diversi test:

- **T cell epitope:** è un modello *in silico* che identifica gruppi di epitopi di cellule T condivisi tra alleli HLA-DPB1* che vanno a determinare l'alloresponsività specifica di tale *locus*. La classificazione degli alleli HLA-DPB1* in gruppi di epitopi T (**TCE-Groups**) viene utilizzata per identificare le incompatibilità che potrebbero essere permissive (tollerate) e quelle non permissive (non tollerate) e che aumenterebbero i rischi di complicanze dopo un trapianto di CSE. I mismatch permissivi del TCE HLA-DPB1* sono associati a un'alloreattività delle cellule T *in vitro* più limitata e a rischi di mortalità e recidiva significativamente più bassi dopo un trapianto di CSE da donatore non correlato

rispetto alle loro controparti non permissivi; questo ci suggerisce il ruolo primario di questo algoritmo. Quindi: i mismatch donatore-ricevente, per gli alleli HLA-DPB1* dello stesso gruppo TCE, sono considerati permissivi, mentre quelli tra diversi gruppi TCE sono considerati invece non permissivi. Tale modello è così efficace che è stato inserito nelle linee guida internazionali per la selezione dei donatori non imparentati;

- **CTLp** (dall'inglese *Cytotoxic Lymphocyte Precursor Assay*): è un test *in vitro* che valuta l'estensione della risposta dei linfociti T alloreattivi nei confronti delle molecole HLA allogeniche;
- **Histocheck**: è un test che calcola uno score di compatibilità, in base alle differenze negli amminoacidi;
- **PIRCHES** (dall'inglese *Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes*): è un modello che si basa sull'alloriconoscimento indiretto utilizzando strumenti informatici che vanno a calcolare il processamento e la presentazione degli antigeni.

2. SCOPO DEL LAVORO

L'allo-HSCT è una modalità terapeutica utilizzata per diverse malattie ematologiche ad alto rischio (A. J. Gyawali et al., 2017). Se il paziente non dovesse trovare un donatore perfettamente compatibile o la ricerca del MUD non andasse a buon fine, si opta per un trapianto aploidentico familiare. In questo caso, le cellule staminali da trapiantare provengono da un donatore in parte compatibile con il ricevente; vengono quindi "usate" cellule staminali che per metà corrispondono alle cellule del paziente stesso. Il vantaggio del trapianto aploidentico sta nella disponibilità, quasi immediata ed universale, di donatori aploidentici, il che significa disponibilità universale ed immediata di cellule staminali per il trattamento. Nel trapianto di cellule staminali emopoietiche sono tante le variabili che intercorrono tra la buona riuscita di questo e lo sviluppo, post-trapianto, di una serie di possibili problematiche. Il successo o meno del trattamento, in prima battuta, è influenzato dalla patologia di base del paziente; concorrono naturalmente anche una serie di fattori intrinseci ed estrinseci, come precocità dell'intervento, condizioni cliniche, fase evolutiva della malattia, età del paziente, che sono certamente da tenere in considerazione.

La buona riuscita del trapianto di CSE dipende innanzitutto dal grado di compatibilità HLA tra il donatore ed il paziente; un trapianto con 1 o 2 mismatch HLA, può portare a conseguenze quali la GvHD e aumento della mortalità (Shaw BE¹ et al, 2003).

Presso il Laboratorio di Tipizzazione Tissutale e Processazione CSE dell'Azienda Ospedaliera e Universitaria Nazionale "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria è stato condotto uno studio retrospettivo nel quale si sono valutati 48 pazienti, di cui 32 maschi (66,67%) e 24 femmine (33,33%), afferenti alla S.C. di Ematologia, trapiantati tra il 2019 e il 2023 ed affetti da differenti malattie ematologiche:

- *Leucemia mieloide acuta (LAM)*, 27 casi (56,25%);
- *Leucemia linfatica acuta (LAL)*, 8 casi (16,67%);
- *Linfoma non Hodgkin (LNH)*, 4 casi (8,33%);
- *Hodgkin Disease (HD)*, 4 casi (8,33%);
- *Mielofibrosi (MF)*, 2 casi (4,17%);
- *Mieloma multiplo (MM)*, 1 caso (2,08%);
- *Mielodisplasia (MDS)*, 1 caso (2,08%);
- *Leucemia mieloide cronica (LMC)*, 1 caso (2,08%).

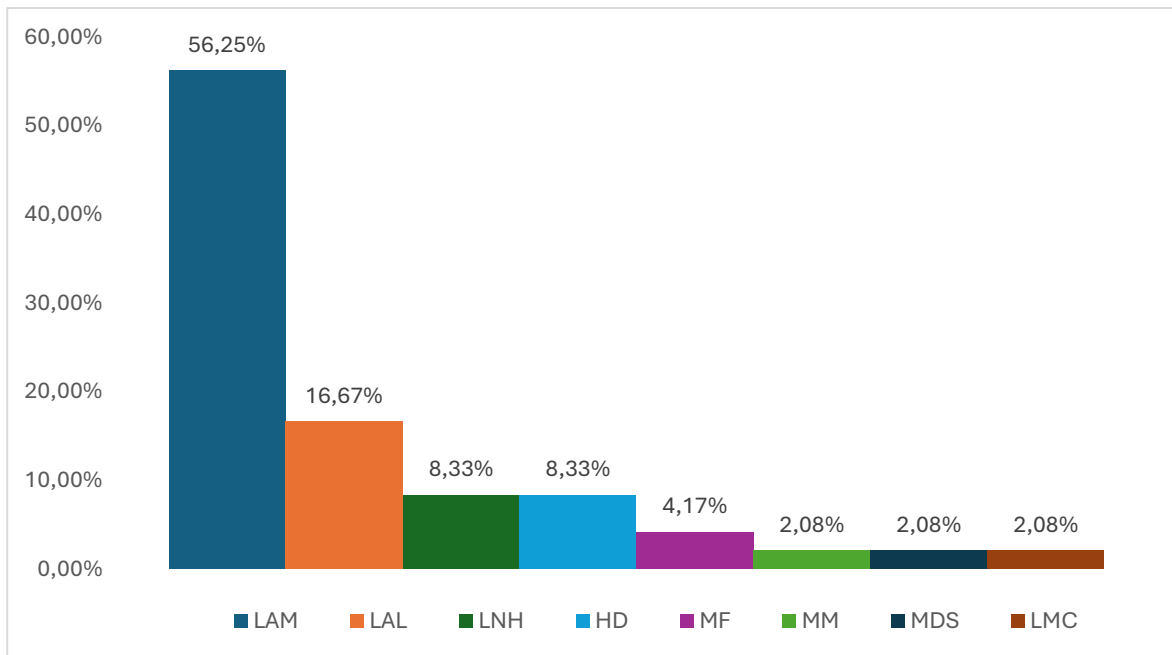


Grafico n.1: percentuale incidenza delle patologie

I dati presi in esame sono stati estrapolati dal software di gestione del laboratorio di tipizzazione HLA:

- età del paziente e del donatore;
- sesso del paziente e del donatore;
- diagnosi del paziente;
- grado di parentela tra paziente e donatore;
- data del trapianto;
- regime di condizionamento;
- attecchimento;
- GvHD acuta e cronica.

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare quanto la permissività e non permissività del mismatch HLA-DPB1*, nel trapianto aploidentico, correla con:

1. incidenza della GvHD acuta;
2. incidenza della GvHD cronica;
3. attecchimento;
4. recidiva;
5. sopravvivenza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata attraverso l'estrattore automatico **Maxwell® CSC 48**.

Lo strumento permette di estrarre il DNA a partire da campioni quali:

- buffy-coat;
- sangue intero (fresco o congelato);
- tamponi buccali.

L'estrattore effettua la lisi cellulare affinché si verifichi il rilascio dell'acido nucleico che, poi, viene legato a delle particelle *paramagnetiche* che permettono di effettuare la separazione dell'acido nucleico dagli altri componenti cellulari. Questo passaggio mira ad ottenere *dsDNA genomico*, che verrà utilizzato nelle successive tecniche di amplificazione genica in Biologia Molecolare.



Figura n.24: estrattore Maxwell® CSC 48.

Il primo passaggio è quello di redigere, al computer, la lista di lavoro dei campioni da estrarre e, successivamente, si prepara lo strumento; si apre il programma “**Maxwell CSC48 IVD**” si inseriscono i nominativi e poi, in base al quantitativo di campioni in lista, si aggiungono al rack il numero esatto di cartucce.

Ogni cartuccia, come ci mostra la figura sottostante, di default contiene il buffer di lisi, le particelle paramagnetiche e il wash buffer; il biologo poi aggiunge il campione di partenza alla cartuccia corrispondente.

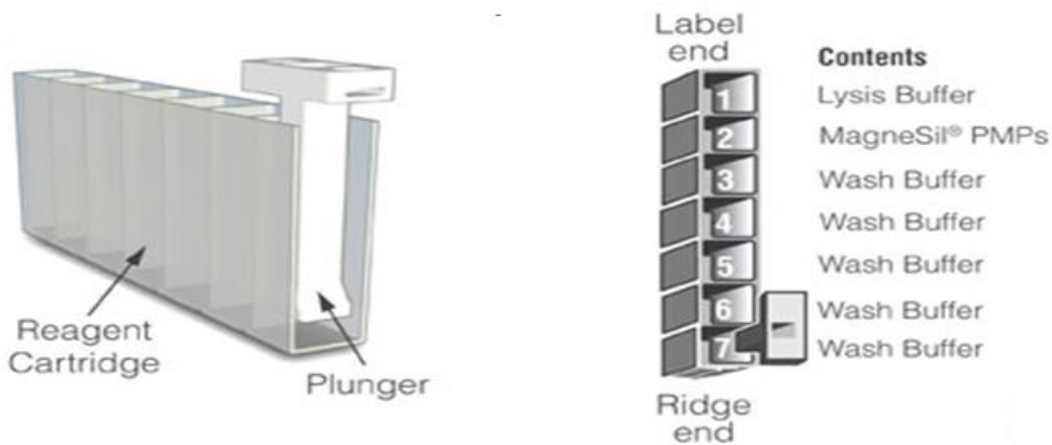


Figura n.25: cartuccia per estrazione

Una volta terminata l'estrazione, si preleva il rack dal carrello dello strumento.

Affinché l'acido nucleico venga separato dalle altre componenti cellulari, il campione estratto viene messo a contatto con un'asta magnetica per qualche minuto. Questo passaggio è molto importante perché, in questo modo, le particelle paramagnetiche saranno attratte al magnete e, di conseguenza, tratterranno tutti gli elementi che non sono utili alle analisi successive; il biologo, quindi, attraverso l'ausilio di una pipetta, raccoglie il *dsDNA* che verrà posto in una nuova eppendorf precedentemente siglata con numero, data, nome e cognome del paziente. Il campione è quindi pronto per le successive analisi.

3.2 Lettura con lo spettrofotometro

Attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro si valuta sia la **concentrazione** che la **purezza** del campione precedentemente estratto, in modo da continuare correttamente le successive fasi analitiche.

I valori sono letti ad una lunghezza d'onda di 260 nm e a 280 nm:

- **la lettura a 260 nm** ci permette di calcolare la concentrazione di DNA nel campione: un valore *Optical Density (OD)* pari a 1 corrisponde a circa 50 ng/ µl di dsDNA;
- **la lettura a 280 nm** ci permette di valutare la concentrazione proteica.

Per procedere con la lettura allo spettrofotometro, viene prelevata una determinata quantità di campione che viene posta all'interno di una cuvetta; affinché possa essere effettuata la lettura la quantità minima di campione da utilizzare è di 50 ng/μl.

La cuvetta presenta una parte liscia ed una parte zigrinata; per avere una lettura ottimale del campione è opportuno posizionare la parte liscia in direzione del raggio.



Figura n.26 cuvetta

Una volta posizionata correttamente la cuvetta e dato l'avvio alla lettura, sullo schermo dello strumento viene mostrato sia il valore della concentrazione che quello della purezza del campione, valori che saranno utili nelle successive fasi analitiche.



Figura n.27: spettrofotometro

Il rapporto tra la lettura a 260 nm e quella a 280 nm permette di stimare la purezza dell'acido nucleico:

- **se il rapporto è pari a 1,8** significa che il composto è puro;
- **se il rapporto è <1,8** significa che c'è una contaminazione con le proteine;
- **se il rapporto è >1,8** significa che c'è una contaminazione con RNA o degradazione del DNA.

Nel caso fosse necessaria una diluizione, questa viene effettuata utilizzando l'**Elution Buffer** e non l'acqua distillata poiché altrimenti il valore del pH non sarebbe definito e, di conseguenza, le letture effettuate con lo strumento risulterebbero pH-dipendenti.

I campioni di DNA, per essere usati nelle successive analisi, devono avere preferibilmente una concentrazione tra 20 e 50 ng/μl ed un rapporto OD²⁶⁰/₂₈₀ compreso tra i 1,65 ed i 1,80.

3.3 Semina su gel di agarosio e corsa elettroforetica

La semina sul gel di agarosio ci permette di separare gli acidi nucleici sfruttando le cariche presenti nelle molecole di DNA, RNA e proteine.

Il gel di agarosio è un supporto poroso che funge da setaccio molecolare, consentendoci di separare le molecole durante la corsa elettroforetica: le molecole più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto quelle più grandi, che “corrono” di meno.

Una volta seminato il campione nel gel, questo viene immerso nella vasca elettroforetica riempita con la stessa soluzione tampone di cui è costituito il gel; si passa quindi all'elettroforesi, metodica basata sulla migrazione, sotto l'impulso di un campo elettrico, di molecole cariche (DNA, RNA o proteine).

Una volta terminata la corsa elettroforetica, trasferiamo il gel di agarosio nel *transilluminatore*, che ci permette di visualizzare, grazie alla presenza di luce ultravioletta (**UV**), le bande finali, corrispondenti alla corsa del campione seminato.

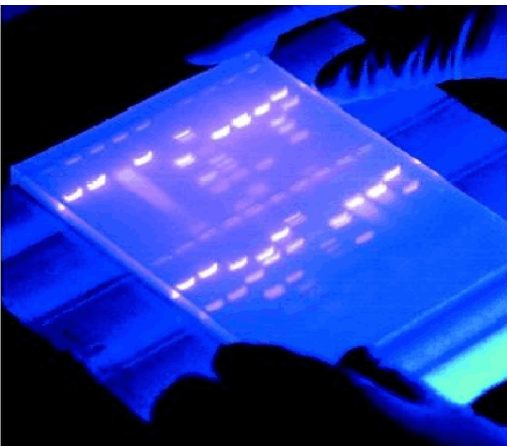


Figura n.28: gel su transilluminatore

Vediamo, dall'immagine n.29, la presenza di diverse bande: una banda di tipizzazione è positiva quando migra più velocemente sul gel rispetto alla banda di controllo interno.

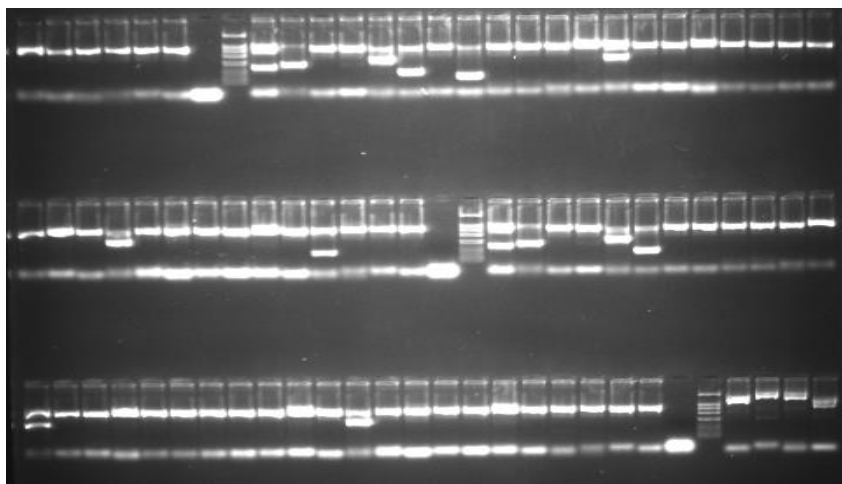


Figura n.29: foto corsa elettroforetica

3.4 LabType SSO con strumento LABScan 3D

Questa metodica si applica laddove si debba eseguire la tipizzazione dei *loci* HLA di classe I e II in bassa e/o alta risoluzione per:

- pazienti ematologici candidati all'allograft di CSE;
- donatori di midollo osseo *related*;
- donatori di midollo osseo *unrelated* (MUD) provenienti da altri CD italiani ed esteri;
- donatori di midollo osseo afferenti al CD AL01;
- studio HLA e malattia.

Il sistema di tipizzazione del DNA *LABType SSO* applica la tecnologia *Luminex* al metodo di tipizzazione con *SSO reverse*. Il *LABType SSO* utilizza sonde *Oligonucleotidiche Sequenza Specifiche (SSO)* legate a microsferes fluorescenti, per l'identificazione degli alleli HLA presenti in campioni di DNA genomico. Il DNA viene amplificato mediante la tecnica della PCR utilizzando un primer gruppo-specifico; il campione amplificato, poi, viene biotinilato per consentire la successiva rilevazione usando *streptavidina* coniugata a *R-ficoeritrina (SAPE)*. Successivamente si ha una reazione di ibridazione DNA-DNA controllata, dove il prodotto della PCR viene prima denaturato e poi re-ibridato a sonde DNA complementari coniugate a miscele di microsferes fluorescenti con sonde nucleotidiche con sequenza specifica per gli alleli HLA; ognuna di queste miscele contiene microsferes di controllo negativo e positivo per la sottrazione dei segnali di fondo non specifici e la normalizzazione dei dati grezzi.

Successivamente viene analizzata l'intensità della fluorescenza della *ficoeritrina (PE)* su ciascuna microsfera, grazie all'utilizzo dell'analizzatore *LABScan 3D*, basato sulla fluorimetria

a celle di flusso. Infine, l'assegnazione della tipizzazione HLA, si basa sul pattern di reazione confrontato ai pattern associati alle sequenze dei geni HLA che sono stati pubblicati.

Come prima cosa viene preparata, per ogni *locus*, una provetta eppendorf da 1,5 mL contenente:

- **Primer;**
- **D-mix;**
- **Taq polimerasi.**

Successivamente si dispensa, in una piastra da PCR, 1 μ l di DNA in tutti i tubini, ad eccezione di quelli per il controllo negativo dove verranno dispensati invece 2 μ l di acqua. Infine viene aggiunta anche la mix (per ogni locus), preparata precedentemente, in tutti i tubini della piastra (compreso il controllo negativo), e si amplifica.

Il passaggio successivo è verificare la corretta amplificazione dei campioni attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

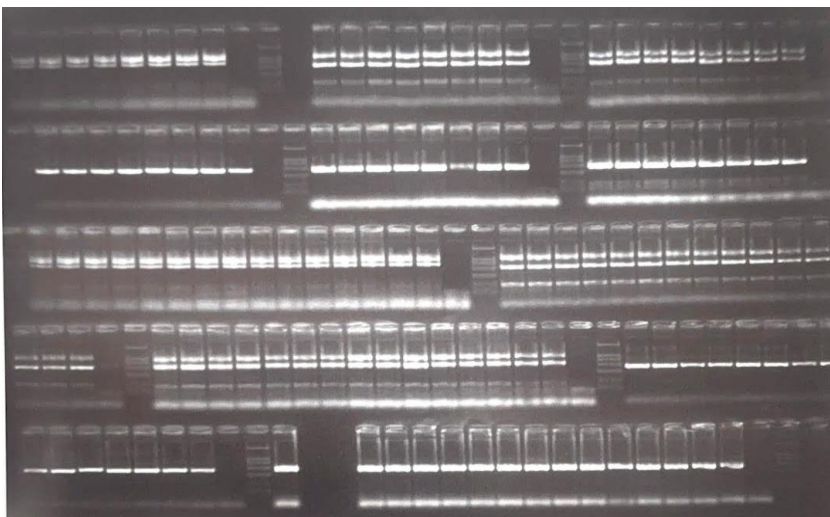


Figura n.30: PCR-SSO su gel di agarosio

Segue il momento di post-amplificazione per discriminare i diversi alleli; in questa fase viene utilizzato lo strumento *LabScan 3D*. Quindi si procede con l'accensione di questo e l'apertura del software *Limunex Xponent*.

Come prima cosa viene fatta la manutenzione dello strumento, previsto ad ogni utilizzo. Una volta fatta, bisogna porre sulla piastra dello strumento tutti i reagenti necessari, che sono:

- **Denaturation Solution;**
- **Neutralization Buffer;**
- **Hybridization Buffer;**
- **Bead mix;**
- **Wash mix.**

Si lavora con una nuova piastra da PCR nella quale si trasferiscono 5 µl di DNA amplificato in ogni tubicino.

Aggiungere 2.5 µl di Denaturation Solution a ciascun tubicino.

Aggiungere poi 5 µl di Neutralization Buffer.

Aggiungere, infine, 38 µl della mix formata da Hybridization Buffer e Bead mix a ciascun tubicino.

La piastra viene poi posta nel termociclatore preriscaldato; una volta finita l'amplificazione si eseguono i lavaggi con il Wash mix.

Al termine del terzo lavaggio si dispensano 50 µl di SAPE Solution in ciascun tubino, viene posta nuovamente la piastra nel termociclatore preriscaldato e, una volta finita l'amplificazione, vengono effettuati nuovamente dei lavaggi.

L'interpretazione finale dei dati, acquisiti dallo strumento LABScan 3D attraverso il *software Luminex Xponent*, avviene tramite il *software HLA fusion*.

Per ogni campione viene visualizzata una videata a 4 pannelli, come quello presente in figura n.31:

- l'adattamento di una biglia selezionata nei controlli di qualità della ditta;
- l'andamento di una biglia selezionata in tutti i campioni del batch in esame;
- l'andamento di tutte le biglie dello specifico campione in analisi;
- la tipizzazione assegnata dal software in base al pattern di positività delle biglie.

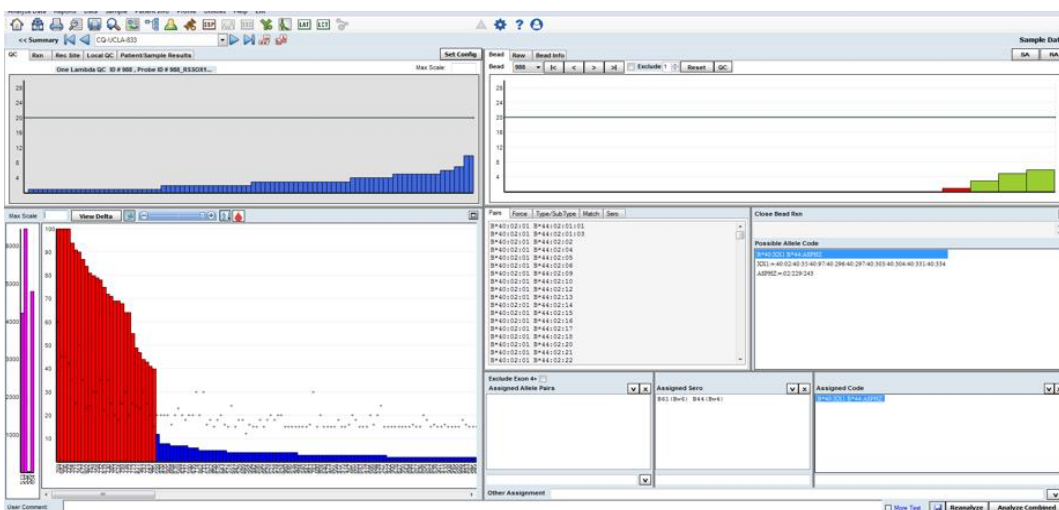


Figura n.31: videata

Per ciascun campione si valuta:

- **biglia di controllo positivo:** devono avere un valore di Intensità Media di Fluorescenza (MFI) tra i 1000 e i 7000; diversamente il campione va ritestato;

- **biglia di controllo negativo:** devono avere un valore di MFI al di sotto del cut-off predisposto dalla ditta; diversamente il campione va ritestato;
- **biglie false positive:** in caso di mancata interpretazione si può intervenire su massimo 3 biglie le cui positività siano appena sotto i loro cut off dichiarati dalla ditta oppure sia stato rilevato che ricorrono come false per un determinato lotto;
- **biglie false negative:** in caso di mancata interpretazione si può intervenire su massimo 3 biglie le cui positività siano appena sopra i loro cut off dichiarati dalla ditta oppure sia stato rilevato che ricorrono come false per un determinato lotto.

3.5 PCR-SSP

La metodica *Sequence Specific Primers* è comunemente utilizzata nella tipizzazione HLA; vengono utilizzate coppie multiple di primer allele-specifiche cis localizzati, per andare a determinare gli alleli che sono presenti in un determinato campione di DNA (M. Bunce, B. Passey, 2013). Quindi la rilevazione avviene attraverso l'utilizzo di primers che riconoscono direttamente, nelle reazioni di amplificazione, le sequenze specifiche di un determinato allele o di un gruppo di alleli, in modo che la positività o la negatività della reazione di PCR sia indice di presenza o di assenza dell'allele nel campione tipizzato.

Questa metodica viene utilizzata soprattutto:

- nei casi in cui la tipizzazione degli alleli di classe I e II effettuata attraverso PCR-SSO/SBT presenta delle ambiguità oppure nel caso in cui non può essere accettata;
- per effettuare la tipizzazione degli alleli di classe I e II, sia in bassa che in alta risoluzione.

La tipizzazione, mediante tale tecnica, prevede l'amplificazione, nel termociclatore, di una determinata sequenza bersaglio di DNA, attraverso l'utilizzo di coppie di primers perfettamente complementari ad un allele o ad un gruppo di alleli; tali coppie di primers consentono l'amplificazione di sequenze specifiche (risultato positivo) e le coppie di primers non complementari non consentiranno invece nessuna amplificazione (risultato negativo).

La scelta di primers con uguale temperatura di allineamento permette di amplificare, usufruendo di un unico programma, il DNA del campione con tutte le *mixes* specifiche.

Quindi si procede con la preparazione della piastra da amplificare; per fare la PCR-SSP serve:

- **DNA;**
- **Primers;**
- **PCR master mix** (*dNTP, buffer, glicerolo, rosso cresolo*);
- **TAQ polimerasi.**

Dopo la fase di PCR i frammenti di DNA amplificati vengono separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, ottenendo delle bande; come abbiamo già detto precedentemente, l'interpretazione si basa sulla presenza o sull'assenza di uno specifico frammento di DNA amplificato e dalla presenza di una banda di controllo interno che funge da indice dell'avvenuta amplificazione.

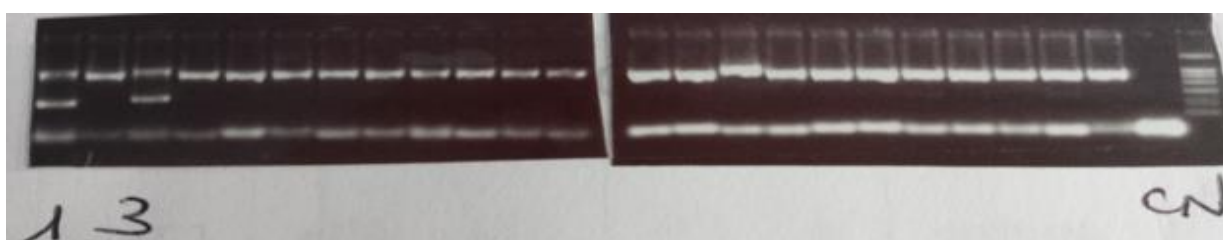


Figura n.32: foto delle bande con positività in posizione 1 e 3

3.6 Utilizzo del database IPD-IMGT/HLA per il calcolo permissività

Per il calcolo della permissività del *locus* HLA-DPB è stato utilizzato il database **IPD-IMGT/HLA** (https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb_v2/), specializzato per le sequenze del complesso maggiore di istocompatibilità umano. Questo presenta le sequenze ufficiali determinate dal **WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System**. Si tratta quindi di un modello clinico-prognostico basato su un algoritmo informatico pubblicato da Crivello, Zito, Sizzano et al. (Crivello P, Zito L, Sizzano F, et al, 2015). Il database ha come scopo quello di mettere a disposizione una serie di strumenti basati su algoritmi e matching pubblicati in modo da facilitare la valutazione dell'abbinamento dell'HLA tra donatore e paziente.

Esistono due versioni di questo tool; in questo caso è stata utilizzata la versione **DPB1 T-Cell Epitope Algorithm v2.0** che, rispetto quella precedente, risulta aggiornata rispetto la pubblicazione di Crivello et al. (Crivello P, Zito L, Sizzano F, et al, 2015). Una volta entrati sul sito viene chiesta la tipizzazione sia del donatore che del paziente:

Prospective HLA-DPB1 Typing			
Prospective Patient 1	DPB1*	<input type="text"/>	DPB1* <input type="text"/>
Prospective Donor 1	DPB1*	<input type="text"/>	DPB1* <input type="text"/>

Add Further Donors

Figura n.33: videata sito permissività HLA-DPB1*

Una volta cliccato sul tasto “Predict!” si ottiene la predizione dell’immunogenicità di ciascun allele espresso da paziente e donatore.

Gli alleli vengono classificati in tre gruppi: alto, intermedio e basso potenziale immunogenico e, sulla base di tale classificazione, i mismatch possono essere:

- **permissivi** se:
 - gli alleli del donatore e ricevente appartengono allo stesso gruppo;
 - donatore e ricevente presentano almeno un allele del gruppo 1;
 - sia il donatore che il ricevente non hanno un allele del gruppo 1 ma hanno almeno un allele del gruppo 2.
- **non permissivi**, che si dividono in:
 - **GvH** (*Graft Versus Host*) si verifica se il ricevente possiede uno o più alleli non presenti nel donatore e si innesca una risposta alloreattiva da parte delle cellule del donatore contro i tessuti del paziente;
 - **HvG** (*Host Versus Graft*) si verifica se il donatore possiede uno o più alleli non presenti nel paziente e si innesca una risposta alloreattiva da parte delle cellule T del ricevente contro le cellule del donatore.

Predicted Results

Patient Typings: PROSPECTIVEPATIENT1

Allele	TCE Group	Predicted Immunogenicity	Comments
DPB1*04:01	3	Low	
DPB1*04:01	3	Low	

Donor Typings: PROSPECTIVEDONOR1

Allele	TCE Group	Predicted Immunogenicity	Comments
DPB1*03:01	2	Intermediate	
DPB1*04:01	3	Low	

Prediction

Results
The predicted immunogenicity of the DPB1 matching for this pair is: Non-Permissive HvG

Figura n.34: esempio di calcolo del mismatch

4. RISULTATI

4.1 Coppie donatore-paziente e dati clinici

NUMERO DI PAZIENTI 48	
FIGLI	23 (48%)
FRATELLI	18 (38%)
GENITORI	3 (6%)
NIPOTI	2 (4%)
CUGINI	2 (4%)

Tabella n1: Numero e tipologia di donatore aploidentico

	ATTECCIMENTO N°pz	GvHD ACUTA N°pz	GvHD CRONICA N°pz	RECIDIVA N°pz	SOPRAVVIVENZA N°pz
SI	47/48 (97,92%)	18/48 (37,50%)	16/48 (33,34%)	10/48 (20,83%)	31/48 (64,58%)
NO	1/48 (2,08%)	30/48 (62,50%)	31/48 (64,58%)	37/48 (77,09%)	17/48 (35,42%)
NON VALUTABILE	-	-	1/48 (2,08%)	1/48 (2,08%)	-

Tabella n2: Dati relativi all'attecchimento, GvHD acuta e cronica, recidiva e sopravvivenza dei pazienti sottoposti al trapianto aploidentico

	Tempo medio (giorno)
ATTECCIMENTO	22
SOPRAVVIVENZA	366

Tabella n.3: Tempo di attecchimento e sopravvivenza

4.2 Mismatch permissivi e mismatch non permissivi

PAZIENTE	DONATORE	ESITO
05:01 ; 14:01	14:01 ; 17:01	Non-Permissive HvG
02:01 ; 04:02	02:01 ; 02:01	Permissive
04:01 ; 05:01	02:01 ; 05:01	Permissive
03: 01 ; 04:01	03:01 ; 04:01	Permissive
04:01 ; 138:01	04:01 ; 138:01	Permissive
04:01 ; 04:02	02:01 ; 04:01	Permissive
04:01 ; 04:01	04:01 ; 10:01	Non-Permissive HvG
02:02 ; 04:01	02:02 ; 02:01	Permissive
02:01 ; 04:01	02:01 ; 02:01	Permissive

04:02 ; 13:01	02:01 ; 04:02	Permissive
02:01 ; 02:01	02:01 ; 03:01	Non-Permissive HvG
04:01 ; 04:01	03:01 ; 04:01	Non-Permissive HvG
04:01 ; 04:01	04:01 ; 138:01	Permissive
02:01 ; 03:01	03: 01 ; 03:01	Permissive
02:01 ; 04:01	04:01 ; 04:01	Permissive
04:01 ; 04:02	04:01P ; 04:02P	Permissive
02:01 ; 04:02	02:01P ; 02:01P	Permissive
02:01 ; 04:01	03:01 ; 04:01	Non-Permissive HvG
04:01 ; 04:02	02:01 ; 04:02	Permissive
04:01 ; 04:02	04:01P ; 04:01P	Permissive
02:01 ; 04:02	02:01 ; 11:01	Permissive
04:01P ; 23:01P	04:01P ; 04:01P	Permissive
02:01 ; 04:01	03:01P ; 04:01P	Non-Permissive HvG
02:01P ; 04:02P	03:01P ; 04:01P	Non-Permissive HvG
02:01P ; 04:01P	02:01P ; 04:01P	Permissive
04:02 ; 06:01	02:01P ; 04:01P	Non-Permissive GvH
04:01P ; 04:01P	04:01P ; 04:01P	Permissive
04:01P ; 04:02P	04:01P ; 04:02P	Permissive
02:01P ; 14:01P	02:01P ; 14:01P	Permissive
04:01P ; 13:01P	04:01P ; 13:01P	Permissive
02:01P ; 23:01P	02:01P ; 23:01P	Permissive
02:01P ; 04:02P	04:02P ; 04:02P	Permissive
03:01P ; 14:01P	03:01P ; 03:01P	Permissive
04:01P ; 04:02P	04:01P ; 04:01P	Permissive
03:01P ; 04:02P	03:01P ; 06:01P	Permissive
03:01P ; 04:01P	02:02 ; 03:01	Permissive
02:01 ; 03:01	02:01P ; 04:01P	Non-Permissive GvH
03:01P ; 04:01P	02:01P ; 04:01P	Non-Permissive GvH
04:01P ; 04:01P	04:01P ; 04:01P	Permissive
02:01P ; 02:01P	02:01P ; 02:01P	Permissive
03:01P ; 35:01P	04:01P ; 35:01P	Permissive
03:01P ; 04:01P	02:01 ; 06:01	Permissive
02:01P ; 04:01P	02:01P ; 04:01P	Permissive
01:01P ; 04:02P	01:01P ; 04:02P	Permissive
02:01P ; 02:01P	02:01P ; 02:01P	Permissive
02:01P ; 02:01P	02:01P ; 04:02P	Permissive
02:01P ; 13:01P	02:01P ; 13:01P	Permissive
02:01P ; 04:01P	04:01P ; 09:01P	Non-Permissive HvG

Tabella n.4: Mismatch permissivi e non permissivi riscontrati dalla tipizzazione dei pazienti e dei donatori

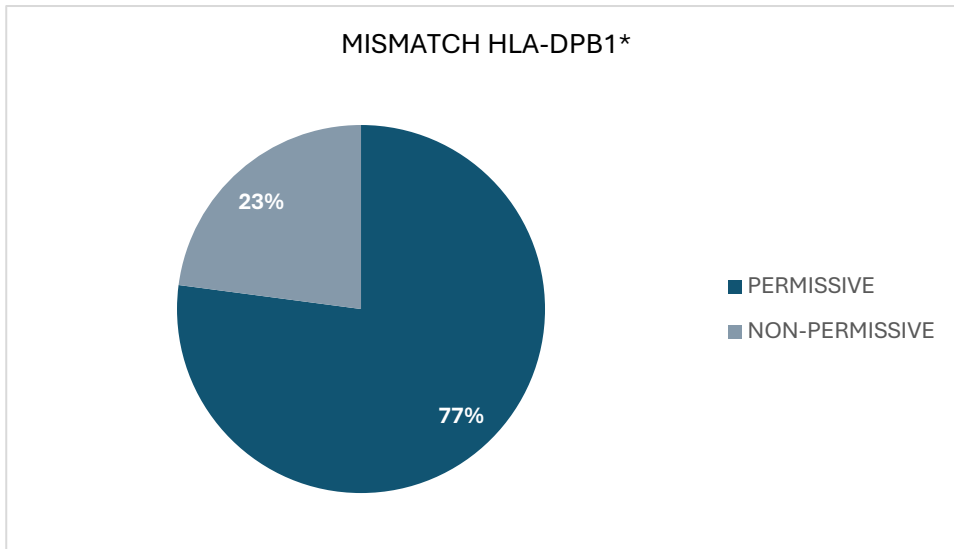


Grafico n.2: Rappresentazione percentuale tra mismatch permissivi e mismatch non permissivi

NON-PERMISSIVE HvG (Host versus Graft)	NON-PERMISSIVE GvH (Graft versus Host)
8/11 (73%)	3/11 (27%)

Tabella n.5: Mismatch non-permissive HvG (Host versus Graft) e non permissive GvH (Graft versus Host)

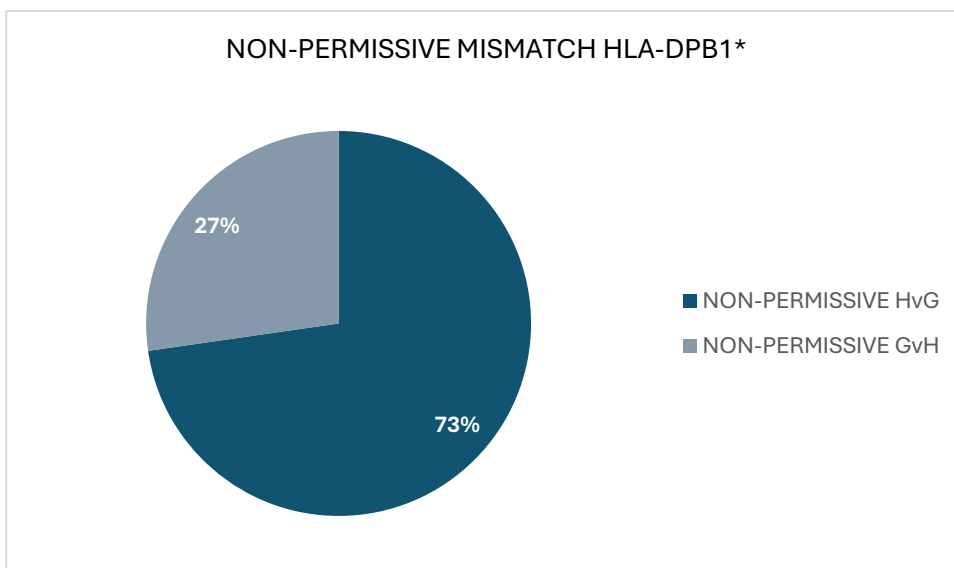


Grafico n.3: Rappresentazione della percentuale tra mismatch non permissivi per HvG e GvH.

4.3 GvHD

4.3.1 GvHD acuta

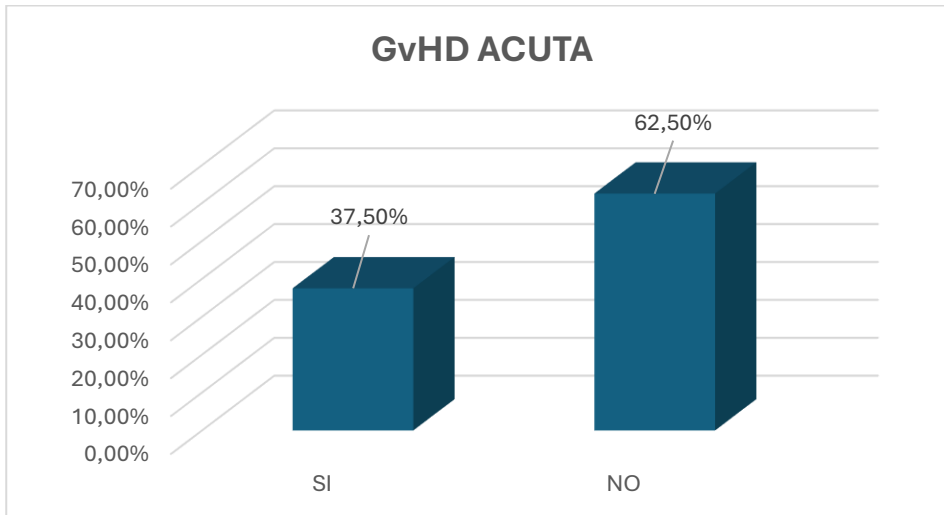


Grafico n.4: Rappresentazione della percentuale di GvHD acuta nei pazienti

	aGvHD II-IV	aGvHD III-IV
PRESENTE	18/48 (37,50%)	3/48 (6,25%)
ASSENTE	28/48 (58,33%)	43/48 (89,58%)
NON VALUTABILE	2/48 (4,17%)	2/48 (4,17%)

Tabella n.6: Dati relativi alla GvHD acuta II-IV e III-IV

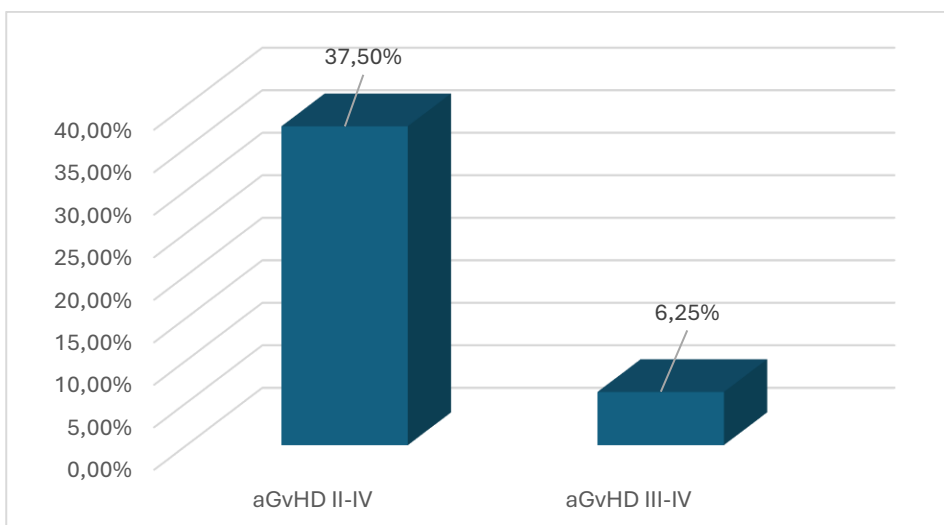


Grafico n.5: Rappresentazione della percentuale di aGvHD II-IV e aGvHD III-IV

4.3.2 GvHD cronica

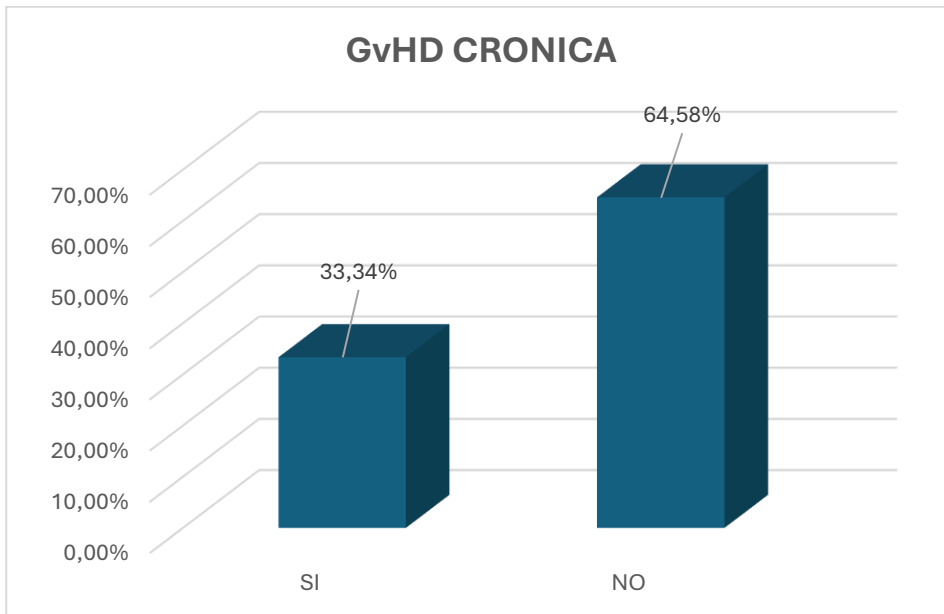


Grafico n.6: Rappresentazione della percentuale di GvHD cronica nei pazienti

4.3.3 Mismatch permissivi e non permissivi e correlazione con la GvHD acuta e cronica

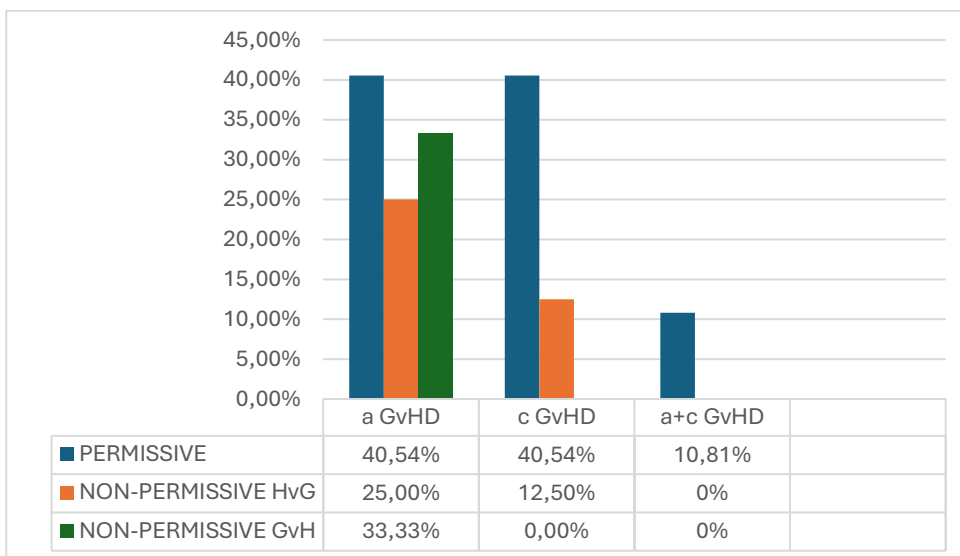


Grafico n.7: Rappresentazione del confronto tra mismatch permissivi e non permissivi GvH e HvG e a/cGvHD

4.4 Mismatch permissivi e non permissivi e correlazione con l'attecchimento

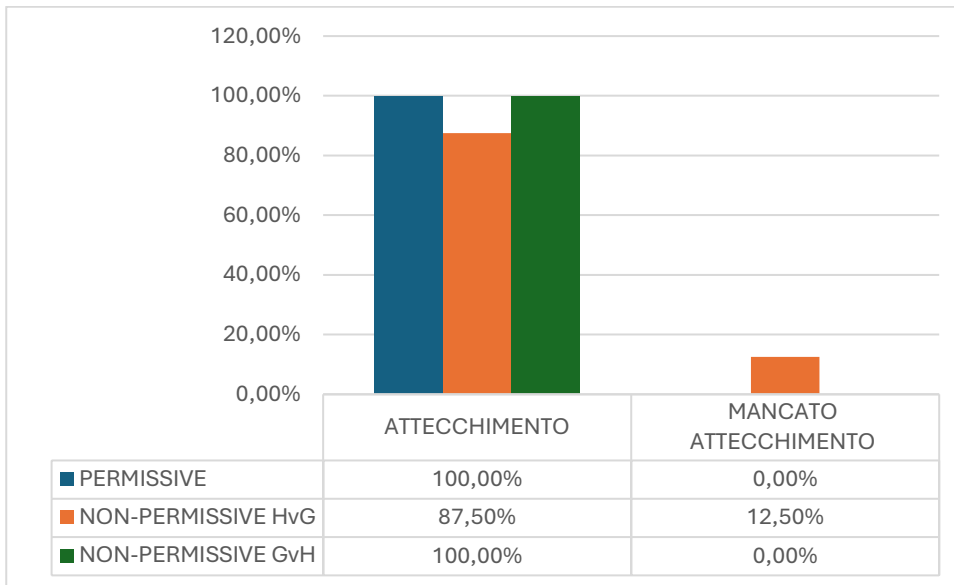


Grafico n.8: Rappresentazione del confronto tra mismatch permissivi e non permissivi GvH e HvG e attecchimento

4.5 Recidiva

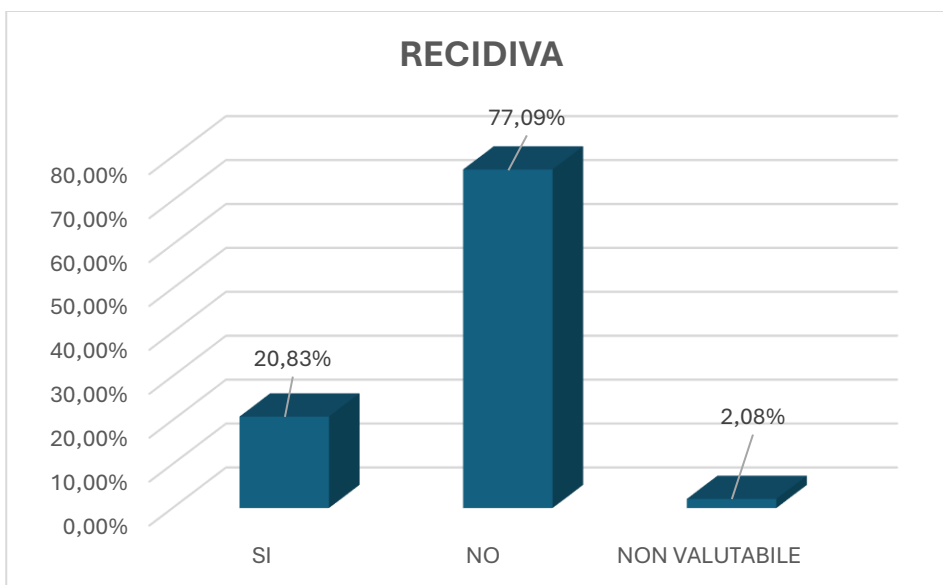


Grafico n.9: Rappresentazione della percentuale di recidiva nei pazienti

4.5.1 Mismatch permissivi e non permissivi e correlazione con la recidiva

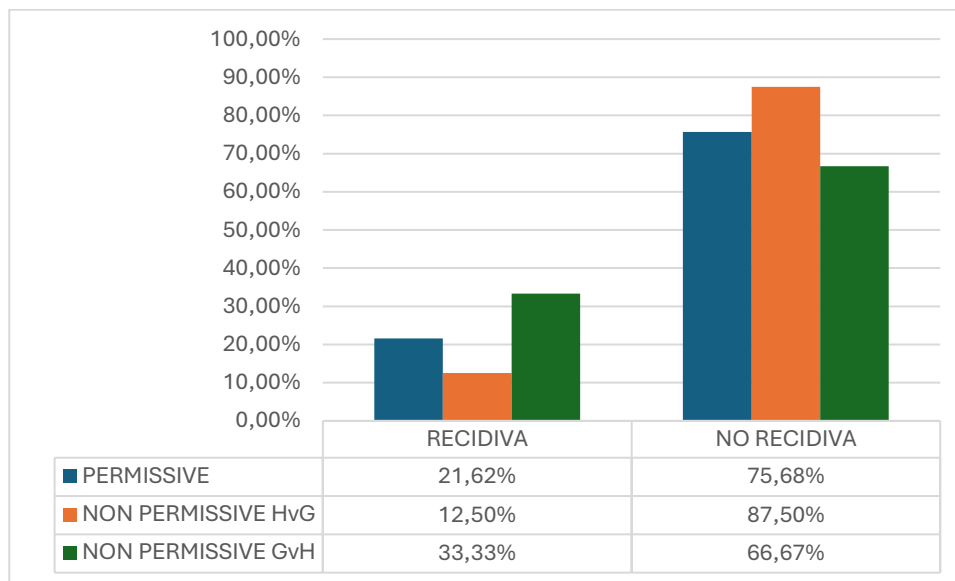


Grafico n.10: Rappresentazione del confronto tra mismatch permissivi e non permissivi GvH e HvG e recidiva

4.6 Sopravvivenza

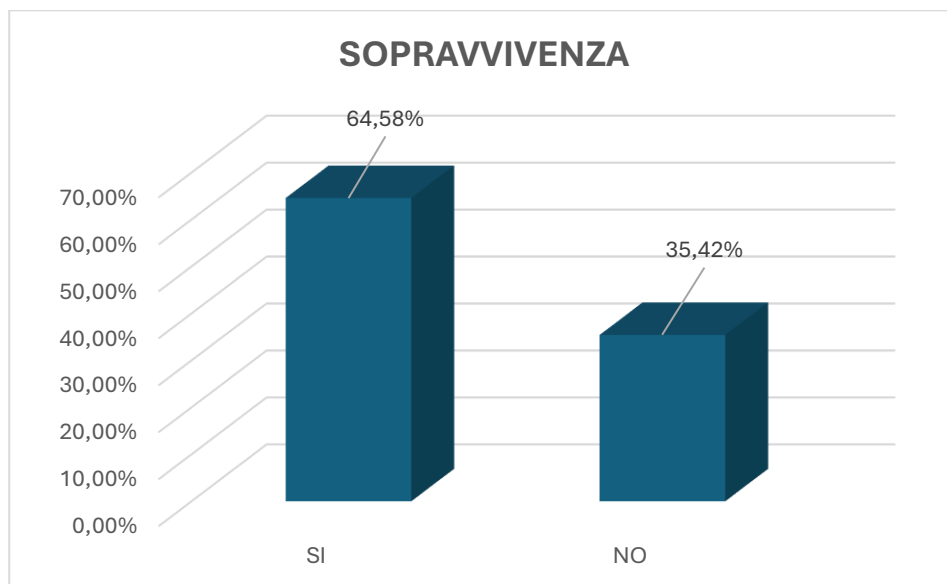


Grafico n.11: Rappresentazione della percentuale di sopravvivenza nei pazienti

4.6.1 Mismatch permissivi e non permissivi e correlazione con la sopravvivenza

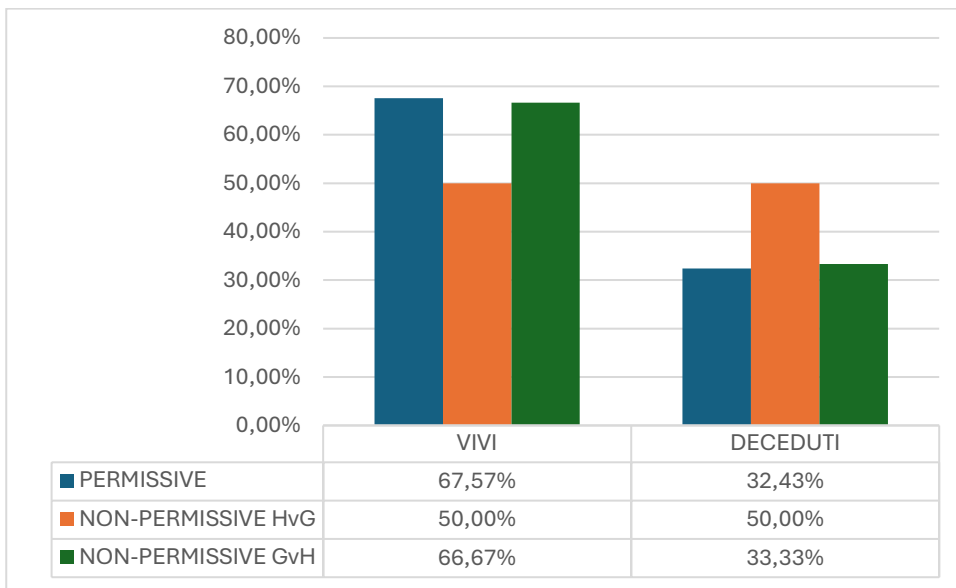


Grafico n.12: Rappresentazione del confronto tra mismatch permissivi e non permissivi GvH e HvG e sopravvivenza

5. DISCUSSIONE

L'applicazione ed il miglioramento delle metodologie di tipizzazione del sistema HLA contribuiscono ad incrementare la sopravvivenza dei pazienti trapiantati, grazie alla corretta selezione del donatore.

Il trapianto aploidentico di cellule staminali da sangue periferico è una delle soluzioni adottate in ambito del trattamento delle malattie ematologiche, grazie anche all'utilizzo dell'agente farmacologico ciclofosfamide.

Il lavoro svolto si prefigge l'obiettivo di valutare ed analizzare, in maniera retrospettiva, l'andamento di 48 trapianti aploidentici da donatore familiare, effettuati nel periodo compreso tra il 2019 ed il 2023.

In particolare, sono stati presi in considerazione e, quindi analizzati, differenti parametri in correlazione con la permissività e non permissività del mismatch HLA-DPB1* nel trapianto aploidentico; i parametri sono:

1. incidenza della GvHD acuta;
2. incidenza della GvHD cronica;
3. attecchimento;
4. recidiva;
5. sopravvivenza.

Abbiamo quindi confrontato i risultati derivanti dall'analisi svolta con quelli presenti in letteratura, anche se consapevoli di avere un campione numericamente modesto.

5.1 Coppie donatore-paziente e diagnosi

L'analisi retrospettiva è stata condotta su 48 pazienti con una età mediana di 53 anni (range 23-72 anni) che hanno subito un trapianto aploidentico di cellule staminali da sangue periferico (**PBSCT**). I donatori più frequenti sono rappresentati dai figli (48%), seguiti dai fratelli (38%), dai genitori (6%), nipoti (4%) e cugini (4%) (tabella n.1).

Il grafico n.1 ci mostra le varie malattie riscontrate; la diagnosi più frequente è stata la *Leucemia Mieloide Acuta (LAM)* con 27 casi (56,25%); abbiamo poi la *Leucemia Linfatica Acuta (LAL)* con 8 casi (16,67%); a seguire abbiamo sia il *Linfoma Non Hodgkin (LHN)* che *Hodgkin Disease (HD)*, che hanno colpito 4 pazienti (8,33%); la *Mielofibrosi (MF)* invece ha colpito 2 pazienti in totale (4,17%); infine, la *Mielodisplasia (MDS)*, il *Mieloma Multiplo (MM)* e la *Leucemia Mieloide Cronica (LMC)* hanno colpito 1 paziente (2,08%).

5.2 Alleli HLA-DPB1*

Il calcolo della permissività degli alleli HLA-DPB1* è uno strumento utile ai fini del buon esito del trapianto; i mismatch sono considerati permissivi se la struttura degli epitopi delle cellule T espresse è analogo nelle coppie ricevente-donatore, sono invece considerati non permissivi se vi sono differenze nella struttura degli epitopi delle cellule T, situazione che può esporre il paziente ad un maggiore rischio di problematiche post-trapianto (J. Zou et al., 2022).

La tabella n.4 ci mostra le coppie di alleli paziente-donatore riscontrate, con il relativo esito "*Permissive*", "*Non-permissive HvG*" (Host versus Graft) e "*Non-permissive GvH*" (Graft versus Host), calcolato mediante l'utilizzo del database **IPD-IMGT/HLA** (https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb_v2/).

Dall'indagine effettuata si evince che un numero consistente di coppie donatore-paziente presenta mismatch permissivi, nello specifico 37 coppie (77%), mentre le coppie con mismatch non permissive sono 11 (23%) (grafico n.2); di queste, 8 coppie (73%) sono mismatch non permissivi HvG e 3 coppie (27%) mismatch non permissivi GvH (tabella n.5, grafico n.3).

5.3 GvHD

La GvHD acuta e/o cronica rappresenta una delle cause principali di insuccesso nei trapianti, che, in forma più o meno aggressiva, colpisce circa il 70% dei pazienti (A.M. Raiola et al., 2014).

Dalla tabella n.2 si evince che 18 pazienti (37,50%) hanno sviluppato GvHD acuta (grafico n.4), mentre 16 pazienti (33,34%) hanno invece sviluppato GvHD cronica (grafico n.6). I risultati riscontrati sono in linea con i dati presenti in letteratura per quanto riguarda l'incidenza di GvHD acuta (35,2%), mentre l'incidenza di GvHD cronica è superiore rispetto al dato della letteratura (23,1%) (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020).

Come vediamo dal grafico n.7, il 40,54% di pazienti con mismatch permissivi ha sviluppato GvHD acuta o GvHD cronica mentre il 10,81% le ha sviluppate entrambe. Il 25% di pazienti con mismatch non permissivi HvG ha sviluppato GvHD acuta, mentre il 12,50% la forma cronica. Infine, il 33,33% di pazienti con mismatch non permissivi GvH ha sviluppato GvHD acuta e nessun paziente la GvHD cronica.

Inoltre, dall'indagine effettuata si evince anche che la GvHD acuta di grado II-IV è stata riscontrata in 18 pazienti (37,50%), invece la GvHD acuta di grado III-IV in 3 pazienti (6,25%) (tabella n.6, grafico n.5). I dati presenti in letteratura sono: 15,4% nel caso della GvHD acuta di grado II-IV, mentre di 6,6% nel caso della GvHD acuta di grado III-IV (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020).

5.4 Attecchimento

Con il termine attecchimento ci si riferisce al valore dei polimorfonucleati (PMN) e delle piastrine calcolato a livello del sangue periferico.

Convenzionalmente si procede con il calcolo a 7 giorni dall'ultima trasfusione di piastrine; l'attecchimento dei neutrofili viene definito come la conta assoluta dei neutrofili $\geq 500/\mu\text{L}$ per almeno 3 giorni consecutivi mentre l'attecchimento piastrinico come la conta di piastrine $\geq 20.000/\mu\text{L}$ per almeno 2 giorni consecutivi.

Come osserviamo dalla tabella n.2, quasi tutti i pazienti (97,92%) hanno mostrato attecchimento, in media al giorno 22 (tabella n.3), in linea con i dati presenti in letteratura, dove la mediana per l'attecchimento mieloide e piastrinico è di 16-17 per l'intera coorte (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020).

Nel nostro caso specifico, l'attecchimento non è stato raggiunto da un solo paziente (2,08%).

Nei pazienti con mismatch permissivi l'attecchimento è stato totale (100%) così come nei pazienti con mismatch non permissivi GvH (100%). Nei pazienti con mismatch non permissivi HvG l'attecchimento si è verificato nel 87,50% dei casi, nel restante 12,50% non si è verificato (grafico n.8).

5.5 Recidiva

Con il termine recidiva si intende una ricomparsa dei sintomi e dei disturbi della malattia originale, nel periodo post-trapianto.

Dall'indagine effettuata si evince che la ripresa della malattia è presente in 10 pazienti (20,83%), è assente in 37 pazienti (77,09%) e non è valutabile in un paziente (2,08%) (tabella n.2, grafico n.9). I risultati di ripresa di malattia sono inferiori rispetto ai dati presenti in letteratura, dove troviamo una percentuale del 36,3% (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020).

In particolare, nei pazienti con mismatch permissivi l'incidenza della recidiva è stata del 21,62%, nei pazienti con mismatch non permissivi HvG del 12,50%, nei pazienti con mismatch non permissivi GvH del 33,33% (grafico n.10).

5.6 Sopravvivenza

Per sopravvivenza si intende la probabilità di restare in vita dopo una patologia ematologica; questa è influenzata da tanti fattori, quali: percorso diagnostico e terapeutico, condizione di partenza del paziente, tempestività dell'intervento.

Dall'indagine effettuata si evince che il 64,58% di pazienti è sopravvissuto al trattamento, di contro il 35,42% di pazienti è deceduto dopo il trapianto (tabella n.2, grafico n.11), in media al giorno 366 (range 16-1012 giorni) (tabella n.3). I risultati ottenuti sono in linea con i dati presenti in letteratura, dove troviamo una percentuale del 60,4% di sopravvivenza contro il 39,4% di pazienti deceduti (J. C. Jaime-Pèrez et al,2020).

Nei pazienti con mismatch permissivi la percentuale di sopravvivenza riscontrata è del 67,57% contro il 32,43% di pazienti deceduti. Nei pazienti con mismatch non permissivi HvG la percentuale di sopravvivenza riscontrata è del 50%. Infine, nei pazienti con mismatch non permissivi GvH, la percentuale di sopravvivenza riscontrata è del 66,67% contro il 33,33% di pazienti deceduti (grafico n.12).

6. CONCLUSIONI

Dalla revisione della letteratura si evince che, per la buona riuscita del trapianto è essenziale la ricerca in tempi rapidi del donatore HLA geneticamente compatibile a livello allelico 12/12 (A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*, DPB1*). La scarsa corrispondenza tra donatore e ricevente potrebbe aumentare il rischio di sviluppare una serie di problematiche post-trapianto, tra le quali la GvHD acuta e/o cronica (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020).

Dallo studio condotto è emerso che la ricerca del donatore compatibile all'interno dei registri nazionali ed internazionali risulta essere, in alcuni casi, molto difficoltosa, tanto da orientare il trapiantologo ai familiari aploidentici.

Il trapianto aploidentico di cellule staminali ematopoietiche potrebbe rappresentare un'ottima soluzione al problema, anche perché non tutti i pazienti hanno un donatore correlato o il tempo necessario per la sua ricerca (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020). Il donatore aploidentico invece, condivide con il paziente un singolo aplotipo HLA e, nella quasi totalità dei casi, risulta essere immediatamente disponibile (J. Sugita, 2019); optare per un aplotrapianto rappresenta quindi un'alternativa che, potenzialmente, potrebbe risultare salvavita (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020).

Nella maggior parte dei casi, i cosiddetti fratelli HLA-compatibili (12/12), presentano entrambi gli alleli HLA-A*, -B*, -C*, -DR*, -DQ* e -DP*; possono però verificarsi delle eccezioni (circa nell'1-5% dei casi) causate dalla ricombinazione genomica. I polimorfismi HLA costituiscono una sorta di barriera per il trapianto; i linfociti T alloreattivi potrebbero riconoscere tali incompatibilità e, di conseguenza, scatenare delle risposte alloreattive (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020). Di solito la frequenza delle ricombinazioni è più alta proprio per l'allele HLA-DP*; per questo motivo è uno dei primi ad essere indagato, per evidenziare, cioè, il possibile mismatch HLA donatore-ricevente (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020).

Il locus HLA-DPB1* gioca quindi un ruolo importante nel trapianto allogenico; a causa del suo elevato polimorfismo può indurre a delle reazioni alloimmuni anche molto severe.

Inizialmente, all'aplotrapianto venivano spesso associate alcune problematiche post-trapianto, quali rigetto e GvHD. Negli ultimi anni, questo trattamento ha registrato un notevole incremento, grazie soprattutto allo sviluppo di diverse strategie, utili al superamento della barriera HLA (J. Sugita, 2019). Una di queste consiste nell'utilizzo dell'agente farmacologico ciclofosfamide (PT-Cy) ad alte dosi post-trapianto.

A conferma di questo in Giappone sono stati condotti, dal “Japan Study Group for Cell Therapy and Transplantation” (JSCT), studi multicentrici di fase II utili alla valutazione, dell’efficacia e della sicurezza, dell’utilizzo di ciclofosfamide post-trapianto aploidentico di cellule staminali da sangue periferico (PTCy-haploPBSCT) (J. Sugita, 2019). Dal primo studio si evince che l’accoppiata PTCy-haploPBSCT unita ad un condizionamento a bassa intensità (**RIC**) ha portato sia ad un attecchimento stabile che ad una bassa incidenza di GvHD acuta e cronica (J. Sugita et al., 2015), mentre dal secondo studio è emerso che sia il condizionamento RIC che quello **MAC** (condizionamento mieloablativo) sono entrambe alternative valide da utilizzare nel trapianto aploidentico di PBSCT con utilizzo di PTCy post-trapianto (J. E. Brammer et al., 2015).

Quindi, dagli studi effettuati, si evince come la PTCy e il trapianto aploidentico risulti essere “un’accoppiata vincente”, da un lato per la disponibilità universale ed immediata del donatore, dall’altro per il fatto che la ciclofosfamide, nel corso delle ricerche, si è dimostrato un farmaco estremamente efficace, sicuro ed economico (J. Sugita, 2019).

A conferma di ciò, citando testualmente E. J. Fuchs et al.: *“la bassa tossicità e la facilità di somministrazione di PTCy hanno fatto sì che i parenti aploidentici diventassero i donatori alternativi preferiti per molti centri clinici in tutto il mondo”* (E. J. Fuchs et al., 2022).

Il trattamento con ciclofosfamide inizia dopo qualche giorno dall’infusione delle cellule staminali ematopoietiche; il suo utilizzo ha ridotto l’incidenza di GvHD acuta e cronica, che ricordiamo essere una delle maggiori e pericolose problematiche post-trapianto. Attualmente l’utilizzo di questo agente farmacologico rappresenta la strategia di prevenzione nei confronti della GvHD più efficace nel trapianto aploidentico (E. J. Fuchs et al., 2022).

In virtù di tutto questo, come ci mostra l’indagine dell’EBMT, negli ultimi anni in Italia si è registrato un aumento dei trapianti aploidentici, con oltre 35 trapianti ogni 10^6 abitanti, a differenza di altre realtà Europee, come la Germania o la Francia, dove il numero di trapianti aploidentici registrati è stato di circa 15 ogni 10^6 abitanti, per la prima, e poco più di 10 ogni 10^6 abitanti, per la seconda (J. R. Passweg et al., 2013).

Nel presente studio retrospettivo si è voluto valutare il ruolo svolto dal *locus* HLA-DPB1* nei trapianti aploidentici da donatore familiare; le analisi sono state svolte nell’Azienda Ospedaliera-Universitaria di Alessandria in un periodo compreso tra il 2019 ed il 2023. I pazienti totali considerati sono stati 48; questi hanno subito un trapianto aploidentico familiare di cellule staminali provenienti da sangue periferico. I donatori più frequenti sono stati figli (48%) e fratelli (38%), poi genitori (6%), nipoti e cugini (entrambi 4%).

L'obiettivo principale è stato quello di verificare quanto la permissività e la non permissività del mismatch HLA-DBP1* nel trapianto aploidentico correli con: GvHD, attecchimento, recidiva e sopravvivenza.

Innanzitutto, è stato valutato il grado di incidenza dei mismatch permissivi e di quelli non permissivi nelle 48 coppie di pazienti; il numero totale di coppie con mismatch permissivi è stato di 37 (77%), rispetto le 11 con mismatch non permissivi (33%). Di queste, 8 erano non permissive per HvG (73%) e 3 non permissive per GvH (27%).

La GvHD rimane un problema significativo nei trapianti aploidentici; colpisce dal 10 al 50% dei riceventi sottoposti a trapianto allogenico (J. C. Jaime-Pèrez et al, 2020).

Nella nostra coorte di pazienti, la GvHD acuta si è sviluppata nel 37,50% dei casi, con maggiore incidenza riscontrata nei pazienti con mismatch non permissivi (58,33%: 25% nelle coppie con mismatch non permissivo HvG e 33,33% nelle coppie non permissive HvG) rispetto quella registrata nei pazienti con mismatch permissivi (40,54%).

Per quanto riguarda la GvHD cronica, questa si è sviluppata nel 33,34% dei casi; l'incidenza maggiore è stata riscontrata nei pazienti con mismatch permissivi (40,54%) rispetto a quella dei pazienti con mismatch non permissivi HvG (12,50%). Invece non ci sono stati casi di GvHD cronica nelle coppie non permissive GvH.

Per quanto riguarda i risultati relativi all'attecchimento, sia i pazienti con mismatch permissivi che quelli con mismatch non permissivi GvH hanno raggiunto il 100% dell'attecchimento; leggermente più bassa ma pur sempre positiva invece la percentuale di attecchimento dei pazienti con mismatch non permissivi HvG (87,50%).

Ulteriore problematica post-trapianto è la recidiva, che rappresenta una delle maggiori cause di morte a 100 giorni dopo il trattamento; l'incidenza registrata è stata del 20,83%.

In particolare, più bassa nei pazienti con mismatch non permissivi HvG (12,50%), più alta nei pazienti con mismatch permissivi (21,62%) e in quelli con mismatch non permissivi GvH (33,33%).

Infine si è valutata la sopravvivenza che, nella nostra indagine, è stata del 64,58%. La percentuale maggiore di sopravvivenza è stata riscontrata nei pazienti con mismatch permissivi (67,57%); leggermente inferiore invece nei pazienti con mismatch non permissivi, dove la percentuale dei sopravvissuti varia dal 50% (non permissivi HvG) al 66,67% (non permissivi GvH).

In conclusione, il dato significativo che emerge dal nostro studio è che un mismatch HLA-DBP1* permissivo favorisce l'attecchimento, diminuisce il rischio di sviluppare GvHD acuta e

favorisce la sopravvivenza del paziente, risultati che sono in linea con i dati presenti in letteratura.

Per quanto riguarda altri dati, quali GvHD cronica e recidiva, si ritiene necessitano un ulteriore approfondimento in quanto in letteratura non c'è concordanza in merito.

Poiché i risultati che emergono dal nostro studio riguardano una casistica limitata, auspichiamo di estendere il nostro progetto a laboratori di altri centri trapianti con l'obiettivo di indirizzare il medico trapiantologo verso la scelta del donatore migliore per il paziente.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Bibliografia

- A. Bacigalupo**: Post- transplant cyclophosphamide: overecoming the HLA barrier to hematopoietic stem cell transplants. vol. 107 n. 6, 2022;
- A. M. Raiola et al**: Unmanipolated Haploidentical Transplants compared with other alternative donors and matched sibling Grafts, 2014 Oct;20(10):1573-9, 2014;
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS**: Immunologia cellulare e molecolare. Piccin Editore; 1998;
- Adhikari J, Gyawali B, Sharma P, Bhatt VR**: Outcomes of haploidentical transplant compared with matched donor allogeneic stem cell transplant. *Future Oncol.* 13:935-44, 2017;
- Albert ED et al.**: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002; *Tissue Antigens.* 60(5): 407-64; Nov 2002;
- Andersson G, Larhammar D, Widmrak E, Servenius B, Peterson LA, Rask L**: Class II genes of the human major histocompatibility complx. Organization and evolutionary relationship of the DR beta genes. *J Biol Chem.* 262: 8748-8758; 1987;
- Appelbaum FR**. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England Journal of Medicine*; 357(15):1472-5, 2007;
- Arata M**: Valutazione retrospettiva del ruolo dei polimorfismi del gene dell'Interleuchina-10, nello sviluppo di GvHD (Graft-versus-Host Disease) in trapianti allogenici di cellule staminali emopoietiche, 2009;
- Arcese W, Iori AP**: Ematologia - Il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche. 1 (4): 4, 1998;
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al**: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 339:1186-93, 1998;
- Bensinger WI**. Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow. *Current Opinion in Oncology* ;24(2):191-6, 2012;
- Boris Labar**: Hematopoietic stem cell transplantation in Zagreb: the first 40 years. *Croat Med J.* 2023 Apr; 64(2): 123–134, 2023;

- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC:** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA A2. *Nature*. 329: 506-512,1987;
- Büchler T, Gallardo D, Rodríguez-Luaces M, Pujal JM, Grañena A:** Frequency of HLA-DPB1 disparities detected by reference strand-mediated conformation analysis in HLA-A,-B, and DRB1 matched siblings. *Hum Immunol*. 63:139-42, 2002;
- Cabrera T, Riuz-Cabello F, Garrido F:** Biological implications of HLA-DR expression in Tumors. *Scand j Immunol*. 41: 398-406, 1995;
- Carcassi C:** HLA: immunogenetica e applicazioni in Medicina. Edizioni SIMTI. 109-122, 2001;
- Carcassi C, Misefari V, Barocchi S:** Organizzazione genomica struttura ed espressione del sistema HLA (da HLA: immunogenetica e applicazioni in medicina); SIMTI, Milano Ed., 2001;
- Chang RJ, Lee S:** Effect of interferon gamma and tumor necrosis factor- α on the expression of an Ia antigen on murine macrophage cell line. *J Immunol*. 137: 2853-2856, 1986;
- Charron DJ, McDevitt HO:** Analysis of HLA-D region associated molecules with monoclonal antibody. *Proc Natl Acad sci*. 76: 6567-6571, 1979;
- Concha A, Riuz-Cabello F, Cabrera T, Nogales F, Collado A, Garrido F:** Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesion of the breast. *Eur J Immunogenetic*. 22: 299-310, 1995;
- Confer DL, Miller JP.** Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. *British Journal of Haematology*; 137:77-8, 2007;
- Crivello P, Zito L, Sizzano F, et al:** 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) 21:233-41, 2015;
- De Coppi P:** "Biologia delle cellule staminali" Periodico d'informazione dell'ADMO notizie. Dic. 2002;
- Dickinson AM:** Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 20 (2): 189-207,2007;
- E. J. Fuchs et all:** HLA informs risk predictions after haploidentical stem cell transplantation with posttransplantation cyclophosphamide *Mar* 10;139(10):1452-1468, 2022;
- E. Spierings, K. Fleischhauer:** Histocompatibility in: *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*: in 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 9, 2019;

- E. Thorsby:** A short history of HLA, *Tissue Antigens* 74 (2) (2009) 101–116 2009;
- Eapen M, Logan BR, Confer DL, Haagenson M, Wagner JE, Weisdorf DJ, et al.** Peripheral blood grafts from unrelated donors are associated with increased acute and chronic graft-versus-host disease without improved survival. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*; 13(12):1461-8, 2007;
- Elaine Dzierzak, Anna Bigas:** Blood development: Hematopoietic stem cell dependence and independence. P639-651, 2018;
- Elmaagacli AH, Beelen DW, Becks HW et al.:** Molecular studies of chimerism and minimal residual disease after allogenic peripheral blood progenitor or bone marrow transplantation. *Bone marrow Transplant.* 18: 397-403, 1996;
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E.** Graft-versus-host disease. *Lancet*; 373(9674):1550-61, 2009;
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al.** National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*;11(12):945-56, 2005;
- Fleischhauer K, Shaw BE:** HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited:challenges and opportunities. *Blood.* 130:1089-96, 2017;
- Formankova R, Honzatkova L, Moracova J, Sieglova Z et al.:** Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukaemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leukemia Research.* 24: 339-347; 2000;
- G. W. Santos, A. H. Owens Jr:** A comparison of the effects of selected cytotoxic agents on allogeneic skin graft survival in rats. 116:327-40, 1965;
- Gluckman E, Rocha V.** Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Current Opinion in Immunology*;18(5):565-70, 2006;
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner C, Neiman P, Clift R.** Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*; 18(4):295-304, 1974;

- Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D.** Results of EBMT activity survey 2005 on hematopoietic stem cell transplantation: Focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation*; 39:71-87, 2007;
- Horwitz ME, Sullivan KM.** Chronic graft-versus-host disease. *Blood Reviews*; 20(1):15-27, 2006;
- HSR, Fondazione San Raffaele del Monte Tabor.** May 2010;
- Istruzione Operativa: LABType SSO con strumento LABscan 3D, AOAL;
- J. C. Jaime-Pérez et al:** Impact of HLA-DPB1 matching on clinical outcomes after haploidentical-related hematopoietic stem cell transplantation. 2(2):69-79, 2020;
- J. E. Brammer et all:** Outcomes of Haploidentical Stem Cell Transplantation for Lymphoma with Melphalan-Based Conditioning. Volume 22, ISSUE 3, P493-498, 2016;
- J. R. Passweg et all.:** Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. Sep;48(9):1161-7, 2013;
- J. Sugita:** HLA-haploidentical stem cell transplantation using posttransplant cyclophosphamide. Jul;110(1):30-38, 2019;
- J. Sugita et all:** HLA-Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide after Busulfan-Containing Reduced-Intensity Conditioning. Volume 21. ISSUE 9, P1646-1652, 2015;
- J. Zou et all.:** Refine HLA-DPB1 mismatch whit molecular algorithms predicts outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. 1;107(4):844856, 2022;
- Jacopo Mariotti, Stefania Bramanri et al:** Haploidentical Stem Cell Transplantation in Lymphomas-Expectations and Pitfalls. 9(11): 3589, 2020;
- Jenq RR, van den Brink MRM.** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immunotherapy of cancer. *Nature Reviews of Cancer*;10(3):213-21, 2010;
- Katharina Fleischhauer¹ et al:** Donor selection for allogeneic hematopoietic cell transplantation;120(15):261-268, 2023;
- Katharina Fleischhauer², B. E Shaw:** HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities, Aug 31;130(9):1089-1096 2017;
- Klein J, Sato A:** The HLA system (First of two parts). *N Engl J Med.* 343: 702-709 2000;

- Kratzin H, Yang C, Gotz H, Pauly E, Kolben S, Egert G, Thinnies PP:** Patibilitätsantigene der Klasse II. 1 Mitteilung: Aminosäuresequenz der N-terminalen 198 Reste der beta-Kette des HLA-DW2, 2; DR2,2-Alloantigens. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem.* 362: 1665-1669, 1981;
- Lancet D, Parham P, Strominger JL:** Heavy chain of HLA-A and HLA-B antigens is conformationally labile: a possible role of β_2 -microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 3844-3848, 1979;
- M. Bunce, B. Passey:** HLA typing by sequence-specific primers. *Immunogenetics.* 1034:147-59, 2013;
- Marek Wieczorek et al.:** Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *PLoS One.* 17:8:292, 2017;
- Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA:** Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science.* 257: 927-934, 1992;
- McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM:** Variation in the tumor necrosis factor- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 371: 508-511; 1994
- Ogawa M:** Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cell. *Blood.* 81: 2844-2853, 1993;
- Olaf Penack et al:** Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for hematological malignancies: update consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 7(2):e157-e167, 2020;
- P, Zito L, Sizzano F, et al.:** 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.* 21:233-41, 2015;
- Paczynski S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P.** New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplantation*;45(1):1-11, 2009;
- Peltenburg LTC, Schrier PI:** Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics.* 40: 54-61, 1994;
- Petersdorf E, Hansen J, Martin P, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, et al.** Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*;345(25):1794-800, 2001;
- Piyanuch Kongtim, Stefan O Ciurea:** Who is the best donor for haploidentical stem cell transplantation?. *Transfusion.* 56(3):194-200, 2019;

- Pollack SM, O'Connor TP, Hashash J, Tabbara IA.** Nonmyeloablative and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *American Journal of Clinical Oncology*;32(6):618-28, 2009;
- R. Crocchiolo, L. Mele et al:** Use of DPB1 T-Cell epitope algorithm among italian transplant centers: A survey on behalf of Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia del Trapianti. *98(2):114-12, 2021;*
- R. Mohty et all:** Post-transplant cyclophosphamide or cell selection in haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation?. *Dec;29(1):2326384, 2024*
- Randi L:** Diabete mellito insulino-dipendente e malattia celiaca: un comune substrato genetico. *9, 19, 2011;*
- Ray Sajulga et al.:** Assessment of HLA-DPB1 genetic variation using an HLA-DP tool and its implications in clinical transplantation. *12;7(17):4809-4821, 2023;*
- Rizzoli V, Carlo-Stella C, Lanza F:** Malattie del sangue e degli organi ematopoietici. McGraw-Hill Ed. 22: 542-543, 1997;
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG, et al:** The IPD and IMGT/HLA database:allele variant databases. *Nucleic Acids Res. 43: D423-31, 2015;*
- Roopenian Derry:** A methods paper that led to much more. *J Immunol (2014) 192 (1): 3-4, 2014;*
- S. J. H. Do Monte et al,:** HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí. *Oct-Dec;50(4):422-6, 2004;*
- ¹Sacchi N, Costa C, Garbarino L:** HLA: immunogenetica e applicazioni in Medicina. Edizioni SIMTI. 187-188, 2001;
- ²Sacchi N, Costa C, Garbarino L:** HLA: immunogenetica e applicazioni in Medicina. Edizioni SIMTI. 190-191, 2001;
- ¹Shaw BE, Potter MN, Mayor NP, Pay AL, Smith C, Goldman JM, et al:** The degree of matching at HLA-DPB1 predicts for acute graft-versus-host disease and disease relapse following haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant. 31:1001-8, 2003;*

- ²Shaw BE, Mayor NP, Russell NH, Apperley JF, Clark RE, Cornish J, et al:** Diverging effects of HLA-DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles. *Leukemia*. 24:58-65, 2010;
- ³Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP, Russell NH, Madrigal JA:** HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. *Blood*. 107:1220-6, 2006;
- Siddiq S, Pamphilon D, Brunskill S, Doree C, Hyde C, Stanworth S.** Bone marrow harvest versus peripheral stem cell collection for haemopoietic stem cell donation in healthy donors, *Jan 21:(1):CD006406*, 2009;
- Stem Cell Trialists' Collaborative Group.** Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematological malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomised trials. *Journal of Clinical Oncology*;23(22):5074-87, 2005;
- Stem Cell Trialists' Collaborative Group.** Individual patient data meta-analysis of allogeneic peripheral blood stem cell transplant vs. bone marrow transplant in the management of hematological malignancies: indirect assessment of the effect of the day 11 methotrexate administration. *Bone Marrow Transplantation*;38(6):539-46, 2006;
- Udo Holtick et al:** Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults. 2014(4):CD010189, 2014;
- Ulas D. Bayraktar, Richard E. Champlin, Stefan O. Ciurea:** Progress in Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Author manuscript; available in PMC 2020 May 8. *Published in final edited form as: Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Mar; 18(3): 372–380, 2011;
- Villa ML, Curtoni E, Illeni MT, Reali G:** La struttura e la funzione delle molecole del maggiore complesso di istocompatibilità (da: Il sistema maggiore di istocompatibilità nell'uomo); SITS-AICT Ed. 1993;
- Slide del corso Applicazioni biotecnologiche e diagnostica (Lia Mele e Laura Mazzucco, Università del Piemonte Orientale);
- Slide del corso Biochimica applicata (Valentina Audrito, Università del Piemonte Orientale);

Sitografia

-<https://ibmdr.galliera.it/>

-<https://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>

-https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/matching/dpb_v2/

-<https://medlineplus.gov/genetics/gene/hla-dpb1/#conditions>

8. RINGRAZIAMENTI

Inizio ringraziando la mia relatrice, la dottoressa Lia Mele, per la sua immensa disponibilità e gentilezza, per avermi accolta in laboratorio, per avermi supportata lungo tutto il percorso e durante la stesura della tesi;

ringrazio il mio correlatore, il dottor Mauro Patrone;

ringrazio le dottoresse: Grazia, Marika, Manuela e Pinuccia per avermi accolta sin da subito e per avermi insegnato tanto;

ringrazio Alessia ed Aurora, le mie compagne di avventura e non solo;

ringrazio tutte le persone del laboratorio di S.C. Medicina Trasfusionale per essere state sempre gentili e disponibili nei miei confronti;

ringrazio tutte le persone a me care;

infine dedico questo mio traguardo ai miei genitori e ai miei fratelli e li ringrazio per avermi sopportata e supportata durante questa faticosa ma preziosissima avventura.