

ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT  
EN EL TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE  
PROGENITORS HEMATOPOÈTICS. MODULACIÓ  
DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP  
CTLA-4

**Anna Bosch Vizcaya**

Per citar o enllaçar aquest document:  
Para citar o enlazar este documento:  
Use this url to cite or link to this publication:  
<http://hdl.handle.net/10803/398011>

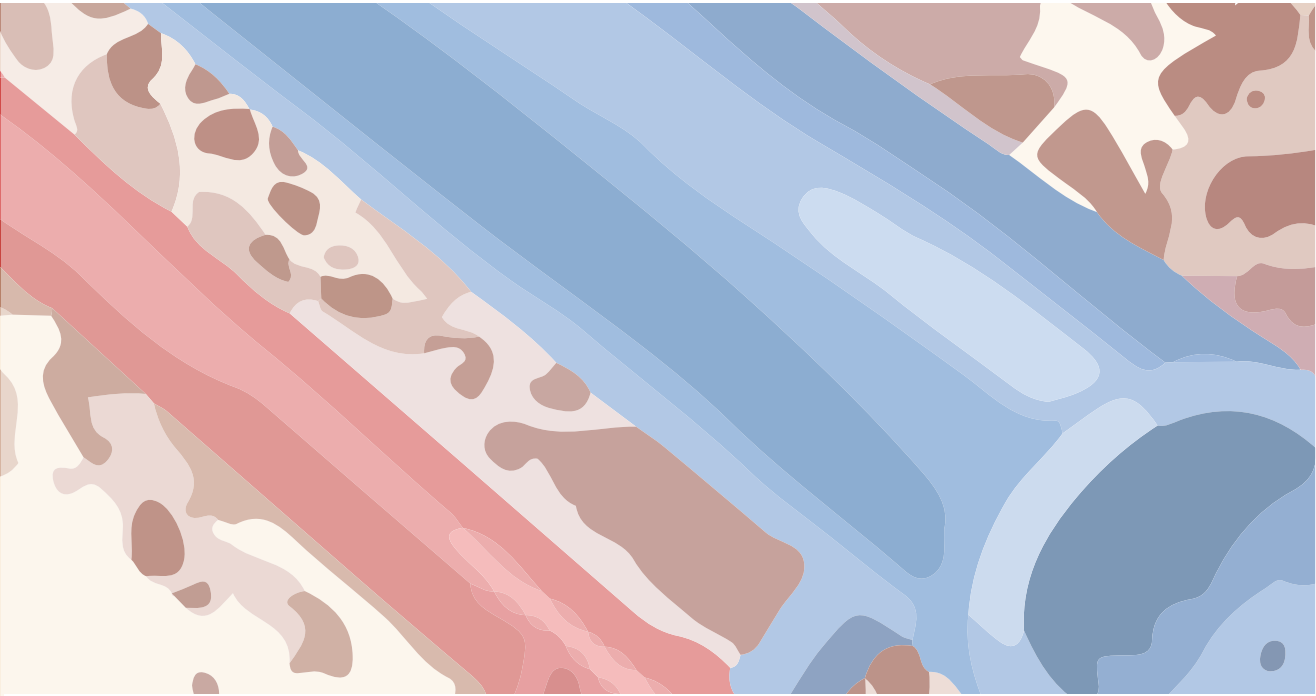
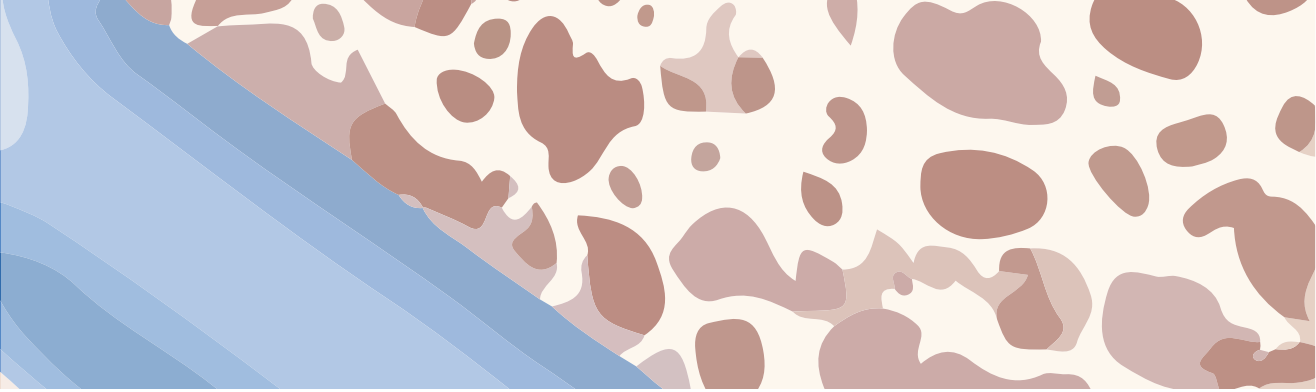


<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement

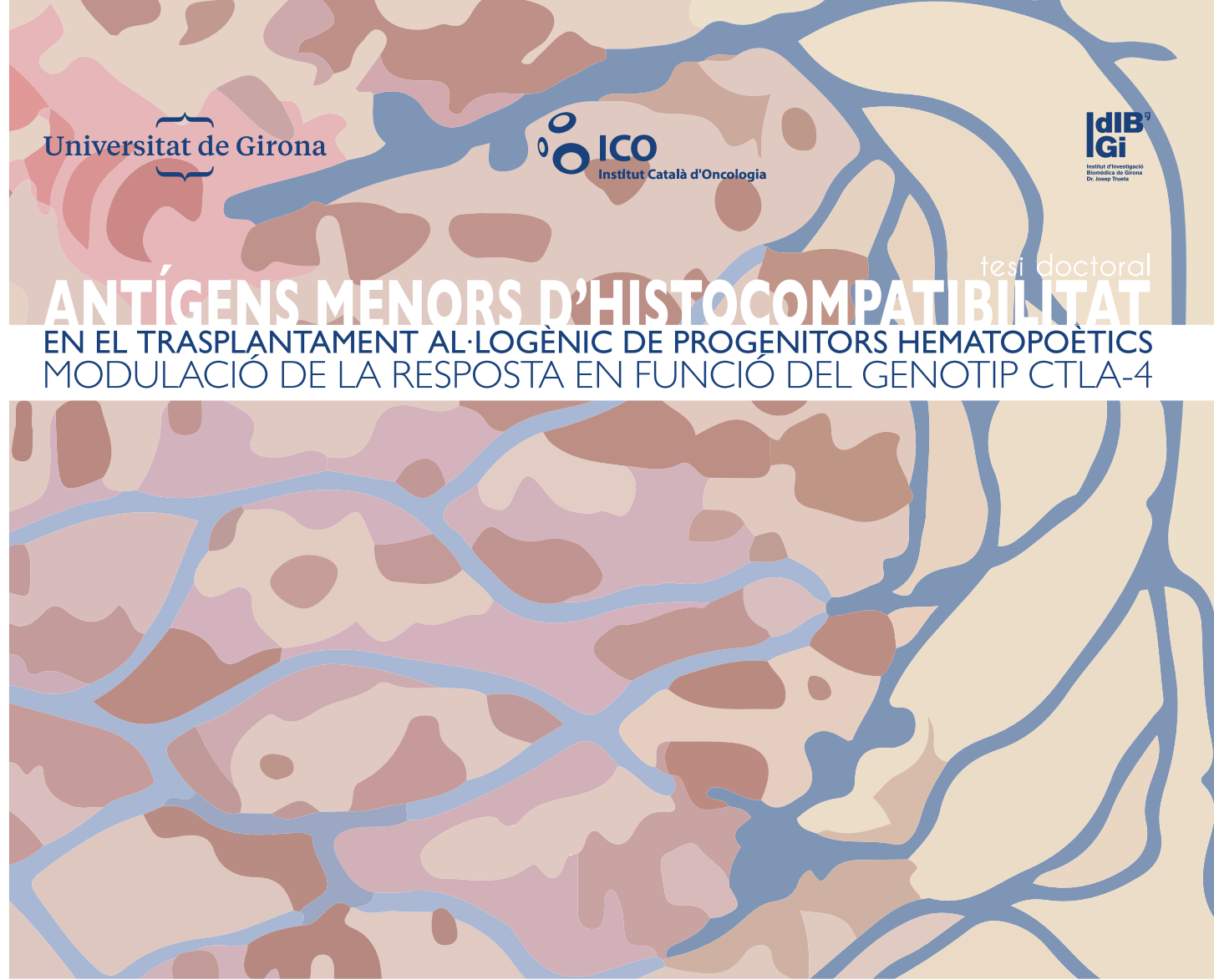
Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento

This work is licensed under a Creative Commons Attribution licence



**ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT**  
EN EL TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS  
MODULACIÓ DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP CTLA-4

Anna Bosch Vizcaya



Universitat de Girona

ICO  
Institut Català d'Oncologia

IdIB  
Gi  
Institut d'Investigació  
Biomèdica de Girona  
Dr. Josep Trueta

tesis doctoral  
**ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT**  
EN EL TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS  
MODULACIÓ DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP CTLA-4

Anna Bosch Vizcaya | 2016





TESI DOCTORAL

**ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT EN EL  
TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS.  
MODULACIÓ DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP CTLA-4**

Anna Bosch Vizcaya

2016







TESI DOCTORAL

**ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT EN EL  
TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS.  
MODULACIÓ DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP CTLA-4**

La present tesi doctoral conté annexos (Annex I i Annex II)

Anna Bosch Vizcaya

2016

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOLOGIA MOLECULAR, BIOMEDICINA I SALUT

Dirigida per:

David Gallardo Giralt

Tutora:

Elisabeth Pinart Nadal

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona



El Dr. David Gallardo Giralt, cap de servei d'Hematologia Clínica de l'Institut Català d'Oncologia de Girona, de l'hospital Dr. Josep Trueta de Girona.

DECLARO:

Que el treball titulat ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT EN EL TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS. MODULACIÓ DE LA RESPOSTA EN FUNCIÓ DEL GENOTIP CTLA-4, que presenta Anna Bosch Vizcaya per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció.

I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Signatura



Girona, 04 de marc de 2016



*“M’agradaria poder-te dir que un s’acostuma a veure morir la gent. Jo mai ho he fet. No vull. Se'm fa una ferida a l'ànima cada cop que algú que estimo mor, prescindint de les circumstàncies. Però jo no vull que “no m’importi”. No vull que sigui una cosa que simplement passa. Les meves cicatrius són un testimoni de l’amor i la relació que tenia amb aquesta persona. I si la cicatriu és profunda, llavors era amor. Les cicatrius són un testimoni de la vida, són un testimoni de tot el que puc estimar i viure profundament. Ser ferit, curar-se, seguir vivint i estimant. I el teixit de les cicatrius és més fort que la carn original, sempre. Les cicatrius són el testimoni de la vida.”*

Anònim



# Dedicatòria i agraïments

---

*“La gratitud en silenci no serveix a ningú”*

*G.B Stern*





## DEDICATÒRIA

Probablement, aquest “apartat” és el que amb més il·lusió escric per poder agrair a totes les persones que m’envolten, l’aportació del seu gra de sorra en el desenvolupament d’aquest treball.

En primer lloc vull nombrar al director de tesi, el Dr Gallardo, a qui haig d’agrair, no la, sinó LES oportunitats brindades per treballar en aquest món, la biomedicina. Gràcies a persones com tu, els biòlegs com jo tenim l’oportunitat de fer-nos un lloc en aquest àmbit. GRÀCIES per tot, per la part laboral, on he tingut l’oportunitat de treballar amb un gran professional i un exemple a seguir, has tret el temps i la paciència d’on ha fet falta per ensenyar-me tot el que sé, no t’has cansat de repetir-me les coses i t’has embrutit les mans quan calia, menys del que t’hagués o ens hagués agradat, però la intenció és el que conta ;). I GRÀCIES de tot cor per la part personal, m’has donat la llibertat de ser on calia quan més ho necessitava. La tranquil·litat que sento en aquests moments, és en gran part, gràcies a tu. No ho oblidaré mai. Tant debò hi haguessin més persones amb el teu tarannà i comprensió. Encantada d’haver coincidit amb tu!!

A la Srta Rocío, gràcies ñiña, les teves paraules van ser probablement, les decisives per començar a escriure. T’estic agraïda per les tantíssimes xerrades i plaques passades! Tan diferents i tan semblants a l’hora... Vull dedicar-te unes paraules: “Chiquitita dime porquéééé!!!!???”

Dra Osca, “equipo albóndiga” al complet! De patosa a patosa i tiro perquè me toca! Encantada d’haver anat a Sevilla amb tu, sinó, encara estaria buscant “el gato negro”!! Gràcies pels ànims en tot moment, pel teu intent de que aprenguéis estadística... i per les xerrades!

Continuant amb el servei d’hematologia, Dr Roncero, un amic! Tot i veure’ns amb conta gotes, hi has sigut i hi ets sempre! Recordo el primer congrés al que vaig assistir, vas estar al meu costat tota l’estona intentant calmar-me. Gràcies per ser-hi per tot! Dra Bustins, Dra Coll, Dr Guardia i Dra Fernandez, gràcies per la vostra dedicació a la feina i per trobar sempre un moment per donar-me una explicació. Dra Gonzalez, benvinguda al món de la biologia, gràcies per l’interés mostrat, tant de bo es puguin dur a terme tots els projectes “maquinats”. Dra Lloveras i Dra Tuset i els esforços comuns per intentar organitzar tot el tema d’SPARC... gràcies per l’esforç!! Miquel, encantada de trobar-te a l’AVE de camí al Biomol i fer-me de traductor de termes mèdics durant les jornades! Gràcies per l’interès mostrat quan vas fer la rotació per

recerca! Dra Santos, gran treballadora! Todo hacia adelante y no importa cuántas guardias haya de por medio! Dr Kelleher, gracias por tus correcciones de inglés! Lore-Lore, no m'oblido de tu! Una agenda amb comes! Gràcies per la teva memòria i recordatoris!!! Per tu també tinc unes paraules: “em pots demanar bolquers, dels que n’hi ha més??!!” i ja ens entenem ;). Junts feu del servei d’hematologia una petita família! Ah! I gràcies a tots els que us vau deixar enganyar per fer-me de donants sans!!

Canviant d’espai, on m’hi he passat més hores: als laboratoris varis de l’IdiBGi. Sr Pardo, per qüestions temporals, has de ser el primer! El destí ens vol junts, vam començar compartint escola, després modul, i finalment feina; entrenyable i sempre disposat a escoltar! Dra Cufí, la meva “peke”, encara és hora que conegui algú com tu, l’adjectiu que més et defineix sota el meu punt de vista és NOBLE. No canviïs mai, gràcies per no tancar mai la porta! Moni Peni!! Una altra joia de la corona, les coses clares i la xocolata espessa, la calma en persona, només incrementes decibels per riure! Tu i en Paco em vau ensenyar com es preparava una *real time* per primer cop! Gràcies! i gràcies per posar sempre la “barraca” a la nostra disposició!! Dr Ortega, no conec a ningú que estimi tant la seva feina, ets un exemple a seguir, tan de bo el destí et tingui una bona sorpresa laboral preparada, te la mereixes!! D’Annabosch a Neuspueyo, sempre em rebs amb un somriure i una abraçada, m’encanta! Òscar, amb una mirada ens entenem, sempre a l’expectativa de quina vena és la millor! Dr Moreno, la teva experiència m’ha ajudat en més d’una ocasió, gràcies! Dra Serrano, sincera i transparent. D’aquí naixé ICUDEN, convertint el lloc de treball en un lloc agradable en el que no importava passar-hi hores! Gràcies a tots per la comprensió, i sobretot, gràcies per continuar contant amb nosaltres tot i les constants negatives... Dra Quintana, constant i consellera; Dra Gubern, organitzada al màxim; Jès, sempre amb un somriure; Pinya, dolça però ferma! Isa, siempre con ganas; Dra Prats, impecable. Dra Carreras et necessito! el corrector ja no dóna a l’abast!!! Dra Oliveras, Cris no!! Treballadora, organitzada, sincera. Dr Vazquez-Martin, gran profesional, cómo sabes tanto??!! Contenta por ti, al fin en tu tierra. Encantada de compartir amb tots vosaltres.

Mencionar a les meves nenes (Miri, Anna, Mariona, Tània i Núria) perquè per més temps que passa, hi sou! Gràcies també als membres del Cafelito trombolikooo, en especial a Jone y a Laura por nuestras conversaciones e intentos de arreglar el mundo, gracias por el apoyo, por escucharme siempre y por el ánimo; desde mi punto de vista creo que ya se cruzó la línea, y pasamos de ser vecinas a ser amigas.

Conscient de que m'allargo, no puc de deixar de dedicar unes paraules a la meva petita GRAN família. Petita Essa, també per qüestions temporals et toca a ser tu la primera. La meva millor amiga, germana, psicòloga i companya. T'estimo. Gràcies, simplement per existir! Estic molt orgullosa de tu (algú diria: ets una nena valenta!), i juntes ens en sortirem de tot bonica! Gràcies per les empentes quan les he necessitat i necessito! *Michael Knight*, no recordo la família sense tu, en formes part i "punt", el meu germà ;)! Gràcies, PER TOT! A tu Christian, MIL GRÀCIES!! Vam decidir compartir camí i ja portem més de vida junts, ets el meu company de viatge, el meu amic, parella, la meva meitat. Gràcies per ser sempre al meu costat, independentment de cap a on bufi el vent, sempre donant-me suport en totes les decisions preses i situacions viscudes; així tot és més fàcil. Orgullosa d'haver iniciat "una nova" vida al teu costat. T'estimo. Gràcies a tots tres pels ànims i per aguantar les meves queixes, dubtes i envalentonar les meves decisions. També, i com no, mil gràcies a les personetes més importants de la meva vida: ELS MEUS PETITS, sou el meu motiu de tirar endavant, amb vosaltres he conegut un amor que no sabia que existia, sou l'energia que m'estira dia a dia, i sou, sense saber-ho, i sense dubte, els que més m'heu ajudat i m'ajudeu, inundeu de llum la foscor. Us estimo incondicionalment i sense mesura. Orgullosa de vosaltres els meus "cucurutxus"! Tan de bo algun dia ho estigueu també vosaltres de mi, com jo dels meus pares. Casi i Amparo, no m'oblido de vosaltres! Gràcies també per ser-hi sempre i en els moments clau, us estic molt agraïda per la comprensió en tot moment!

Ja per acabar, vull dedicar aquesta tesi a les persones que més s'ho mereixen, presents en mi cada instant que passa: ALS MEUS PARES, Amadeu i Angela. Papuxo i mamuxa, GRÀCIES, EN MAJÚSCULA, I BEN ALT!!! PER TOT! Cada vegada que moc fitxa ho faig pensant en vosaltres, sou presents en mi cada dia. US ESTIMO MOLTÍSSIM, US ANYORO ENCARA MÉS, I ESTIC ORGULLOSA DE VOSALTRES, DE LA VOSTRA MANERA, I D'HAVER-VOS TINGUT COM A PARES. Ara us sento dins meu dient que vosaltres també ho esteu de mi, doncs sé la il·lusió que us feia que arribés aquest moment. Cada dia que passa sóc més conscient de lo afortunada que he sigut!!

## AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat realitzat gràcies als següents projectes concedits: FIS11/01690 i FIS14/01646, *Instituto de Salud Carlos III*, cofinanciat per FEDER (*Fondo Europeo de desarrollo regional*) i pel projecte MTV3/120210 de la Fundació Marató de TV3.

# Publicacions derivades de la tesi

---

*“La lectura fa a l’home complet; la conversa, àgil, i  
l’escriure, precís”*

*Sir Francis Bacon*



## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESI

**Bosch-Vizcaya A**, Pérez-García A, Brunet S, Solano C, Buño I, Guillem V, Martínez-Laperche C, Sanz G, Barrenetxea C, Martínez C, Tuset E, Lloveras N, Coll R, Guardia R, González Y, Roncero JM, Bustins A, Gardella S, Fernández C, Buch J, Gallardo D; GvHD/Immunotherapy committee of the Spanish Group for Hematopoietic Transplant (GETH). *Donor CTLA-4 genotype influences clinical outcome after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors*. Biol Blood Marrow Transplant. 2012 Jan;18(1):100-5. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.05.021. Epub 2011 Jun 12.

**Bosch-Vizcaya A**, Rodriguez-Romanos R, Nieto JB, de la Cámara R, Brunet S, Vallejo C, Osca-Gelis G, Martínez-Laperche C, Buño I, Urbano-Ispizúa Á, González M, Jiménez-Velasco A, Gallardo D. *Effect of mismatching for mHA UTA2-1 on clinical outcome after HLA-identical sibling donor allo-SCT*. Bone Marrow Transplant. 2015 Feb;50(2):298-300. doi: 10.1038/bmt.2014.234. Epub 2014 Oct 20. No abstract available.

### *Submitted:*

David Gallardo, M.D., Ph.D., **Anna Bosch-Vizcaya**, MSc., Rocío Rodríguez-Romanos, M.L.T., Nazly Santos, M.D., Ismael Buño, Ph.D., Rafael de la Cámara, M.D., Salut Brunet, M.D., Ph.D., Antonio Jiménez-Velasco, M.D., Ph.D., Marcos González, M.D., Ph.D., Jose B. Nieto, M.D., Carolina Martínez-Laperche, Ph.D., Carlos Vallejo, M.D., Ph.D., Christelle Ferrá, M.D., Ph.D., Antònia Sampol, M.D., Ph.D., Javier López-Jiménez, M.D., Ph.D., José A. Pérez-Simón, M.D., Ph.D., Carmen Martínez, M.D., Ph.D., José L. Díez, M.D., Ph.D., on behalf of the GvHD/Immunotherapy Committee of the Spanish Hematopoietic Transplant Group (GETH). *CTLA-4 genotype and immune responses to minor histocompatibility antigen mismatches*.





# Índex d'abreviatures

---

*“No cal començar sempre per la noció primera de les  
coses que s'estudien, sinó per allò que pot facilitar-ne  
l'aprenentatge”*

*Aristòtil*



## ÍNDIX D'ABREVIATURES PER ORDRE ALFABÈTIC

Aa	Aminoàcid
AAS	Anèmia aplàsica severa
Ag	Antigen
AgmH	Antigen menor d'histocompatibilitat
al·lo-TPH	Trasplantament de progenitors hematopoètics al·logènic
al·lo-TPH-CD34	Trasplantament de progenitors hematopoètics al·logènic amb depleció exhaustiva de cèl·lules T mitjançant selecció positiva de CD34s
auto-TPH	Trasplantament de progenitors hematopoètics autòleg
β2-m	β2- microglobulina
BAFF	de l'anglès " <i>B-cell activating factor</i> "
BCR	Receptors de cèl·lules B
BTLA	de l'anglès " <i>B and T lymphocyte associated</i> "
CD	Cèl·lula dendrítica
CD3	Complex format per 3 proteïnes transmembrana ( $\gamma, \delta, \epsilon$ )
CD34	Proteïna transmembrana característica de cèl·lules mare hematopoètiques
CFU-ML	Unitats formadores de colònies mieloides o limfoides
CFU-X	Unitat formadora de colònies X
CLIP	de l'anglès " <i>class II- associated invariant chain peptide</i> "
CMH	Complex major d'histocompatibilitat
CPA	Cèl·lula presentadora d'antigen
CPL	de l'anglès " <i>compartment for peptide loading</i> "
CSA	Ciclosporina A
CTLA-4	de l'anglès " <i>Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4</i> "
DA	Discriminació al·lèlica
DLI	de l'anglès " <i>donor lymphocyte infusion</i> "
DNE	Donant no emparentat
ECL	Empelt contra leucèmia
fICTLA-4	Isoforma transmembrana de CTLA-4
HLA	de l'anglès " <i>human leukocyte antigen</i> "
HR	Hazard ratio
HSP70	Proteïnes implicades en el xoc tèrmic
IC	Intèrval de confiança
ICOS	de l'anglès " <i>inducible co-stimulator</i> "
Ig	Immunoglobulines
ii	cadena univariant
IL	Interleucines
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfat
ITAM	de l'anglès " <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> "
LFA-1	de l'anglès " <i>leukocyte function-associated antigen 1</i> "
LICOS	Lligand d'ICOS
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LMA	Leucèmia mielocítica aguda

LMC	Leucèmia mielocítica crònica
LT	Limfòcits T
LTC	Limfòcits T citotòxics
mAB	de l'anglès " <i>monoclonal antibody</i> "
MECH	Malaltia d'empelt contra l'hoste
MECHa	MECH aguda
MECHc	MECH crònica
MO	Moll d'os
MRT	Mort relacionada amb el trasplantament
MTX	Metrotexat
NFAT	de l'anglès " <i>nuclear factor activated T cells</i> "
NK	Natural Killer
PCR	de l'anglès " <i>polymerase chain reaction</i> "
PCR-SSP	de l'anglès " <i>polymerase chain reaction with sequence specific primers</i> "
PD-1	de l'anglès " <i>programmed death-1</i> "
PH	Progenitors hematopoètics
RCT	Receptors de cèl·lules T
RE	Reticle endoplasmàtic
RFLP	de l'anglès " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> "
RIC	de l'anglès " <i>reduced-intensity conditioned</i> "
sCTLA-4	Isoforma soluble de CTLA-4
SCU	Sang de cordó umbilical
SG	Supervivència global
SI	Sinapsi immunològica
SLM	Supervivència lliure de malaltia
SMD	Síndrome mielodisplàstica
SNP	de l'anglès " <i>Single nucleotide polymorphism</i> "
SP	Sang perifèrica
Tab	RCT formats per heterodímers de cadenes $\alpha$ i $\beta$
TBI	de l'anglès " <i>total body irradiation</i> "
Tgd	RCT formats per heterodímers de cadenes $\gamma$ i $\delta$
TGI	Tracte gastrointestinal
TNF	de l'anglès " <i>tumor necrosis factor</i> "
TNFR	receptor de TNF
TPH	Trasplantament de progenitors hematopoètics
ZAP-70	de l'anglès " <i>zeta chain associated protein-70</i> "

# Índex de taules i figures

---

*“Existeix un llenguatge que va més enllà de les paraules”*

*Paulo Coelho*



## ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Gradació clínica de la malaltia d'empelt contra l'hoste ( <i>Glucksberg, 1974</i> ).....	35
Taula 2: Característiques de la població incloses en l'estudi dels AgsmH .....	79
Taula 3: Característiques de la població incloses en l'estudi d'immunomodulació dels SNPs de CTLA-4 .....	81
Taula 4: Característiques de la població seleccionada per a l'anàlisi de la influència dels genotips CT60 i +49 de CTLA-4 post al·lo-TPH post- selecció positiva de CD34 .....	82
Taula 5: Freqüències al·lèliques i genotípiques observades <i>versus</i> esperades. Equilibri de H-W .....	104
Taula 6: Estudi d'homogeneïtat de la població pels diferents AgsmH.....	107
Taula 7: Anàlisi multivariant de MECH aguda .....	115
Taula 8: Resultats obtinguts per a MECH crònica en pacients que presenten disparitat en algun AgmH.....	115
Taula 9: Estudi de MECHc extensa en funció de la presència/ absència de disparitat en les diferents AgsmH .....	116
Taula 10: Anàlisi multivariant de recidives .....	118
Taula 11 : Anàlisi multivariant de SG.....	120
Taula 12: Anàlisi multivariant per SLM.....	122
Taula 13: Anàlisi multivariant per MRT.....	124
Taula 14: Anàlisi multivariant per les diferents variables en l'estudi de l'efecte de la presència d' almenys una disparitat.....	127
Taula 15: Anàlisi multivariant per MECHa.....	130
Taula 16: Freqüències al·lèliques i genotípiques observades <i>versus</i> esperades per CT60. Equilibri de H-W .....	131

Taula 17: Freqüències al·lèliques i genotípiques observades <i>versus</i> esperades per +49. Equilibri de H-W .....	132
Taula 18: Estudi d'homogeneïtat de la població segons genotip CTLA-4 .....	133
Taula 19: Anàlisi multivariant MECHa en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4 .....	138
Taula 20: Anàlisi multivariant de SG en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4 .....	140
Taula 21: Anàlisi multivariant per MRT en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4 .....	141
Taula 22: Anàlisi multivariant per MECHa en l'estudi de immunomodulació de l'haplotip de CTLA-4 .....	144
Taula 23: Homogeneïtat dels grups d'estudi pel polimorfisme CT60 i +49 .....	147
Taula 24: Anàlisi multivariant per SG .....	149
Taula 25: Anàlisi multivariant per SLM.....	153
Taula 26: Anàlisi multivariant per recidives .....	153
Taula 27: Anàlisi multivariant per MRT .....	155



## ÍNDEX DE TAULES ANNEX

Taula annex 1: Antígens menors d'histocompatibilitat autosòmics descrits fins al 2014, per ordre alfabètic.....	i
Taula annex 2: Hospitals membres del Grup Espanyol de Transplantament Hematopoetic (GETH) .....	ii
Taula annex 3: Variacions del protocol proposat per <i>Spierings</i> i col·laboradors .....	ii
Taula annex 4: Encebadors i sondes utilitzats per a l'amplificació o detecció dels polimorfismes objecte d'estudi.....	iii
Taula annex 5: Concentracions i condicions de PCR-SSP utilitzats per a l'estudi mHAgS .....	iv
Taula annex 6: Concentracions i condicions de Discriminació al·lèlica mitjançant PCR a temps real .....	v
Taula annex 7: Concentracions, condicions i protocol utilitzat per a la seqüenciació automàtica en electroforesi capil·lar .....	v
Taula annex 8: Concentracions i condicions de PCR i digestió per a l'estudi dels polimorfismes de CTLA-4 .....	v

Figura 1: Esquema de l'ontogènia de la cèl·lula mare. ....	13
Figura 2: Esquema de l'hematopoesi .....	15
Figura 3: Dibuix que representa la leucoafèresi.....	22
Figura 4: Representació esquemàtica del procés d'obtenció de progenitors hematopoètics a partir de sang de cordó umbilical.....	23
Figura 5: El desenvolupament de MECHa .....	32
Figura 6: Gràfica que mostra el nombre al·lèlic de molècules HLA identificades .....	39
Figura 7: Representació esquemàtica del mapa del complex HLA humà .....	41
Figura 8: Representació esquemàtica de l'estructura molecular de HLA .....	42
Figura 9: Representació esquemàtica de la nomenclatura de les molècules HLA.....	43
Figura 10: Representació esquemàtica de la carrega de pèptids endògens en les molècules HLA classe I .....	45
Figura 11: Representació esquemàtica de la carrega de pèptids exògens en les molècules HLA de classe II.....	47
Figura 12: Representació esquemàtica de les afinitats de CD28 i CTLA-4 pels seus lligands .....	54
Figura 13: Representació esquemàtica de les molècules coestimuladores i els seus receptors .....	57
Figura 14: Representació esquemàtica de la obtenció de DNA mitjançant el <i>kit QIAmp<sup>®</sup> DNA Blood Mini kit (250)</i> .....	83
Figura 15: Representació esquemàtica del procediment utilitzat per a la obtenció de cèl·lules nucleades mitjançant <i>Ficoll-Paque PLUS</i> .....	84

Figura 16: Representació esquemàtica de l'amplificació del DNA mitjançant el <i>kit</i> comercial <i>Repli-g Mini Kit</i> .....	85
Figura 17: Representació esquemàtica del funcionament de la PCR.....	88
Figura 18: Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-1 en gel d'agarosa al 2%.....	90
Figura 19: Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-2 en gel d'agarosa al 2%.....	91
Figura 20: Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-8 en gel d'agarosa al 2%.....	91
Figura 21: Representació esquemàtica del funcionament de l'emissió de fluorescència .....	93
Figura 22: Exemple del diagrama de genotipació proporcionat pel <i>7000 system software</i> .....	93
Figura 23: Representació gràfica de les freqüències de disparitat per a cada AgmH en el total de població estudiada.....	105
Figura 24: Gràfics d'incidència acumulada de graus II-IV de MECHa en funció de les disparitats dels AgsmH.....	112
Figura 25: Gràfics d'incidència acumulada d'estadis severos (III-IV) de MECHa en funció dels dies post-trasplantament .....	114
Figura 26: Gràfics d'incidència acumulada de les recaigudes en funció del temps (anys post-trasplantament) per a cadascun dels AgsmH.....	117
Figura 27: Corbes de supervivència en funció de la presència o absència de la disparitat en els AgsmH.....	119
Figura 28: Gràfics que representen la supervivència lliure de malaltia en funció dels anys post trasplantament, per a les disparitats de cadascun dels AgsmH inclosos en l'estudi.....	121

Figura 29: Representació gràfica de la MRT post-al·lo-TPH per a cadascun dels AagsmH .....	123
Figura 30: Representació gràfica de les diferents variables estudiades en funció de l'absència de disparitat <i>versus</i> la presència d' almenys una disparitat .....	126
Figura 31: Representació gràfica de l'efecte acumulatiu de HA-1 i HY en MECHa graus II-IV .....	129
Figura 32: Representació gràfica de l'efecte acumulatiu de HA-8 i HY en MECHa graus III-IV .....	130
Figura 33: Representació gràfica de l'impacte del genotip +49 de CTLA-4 en MECHa graus II-IV.....	136
Figura 34: Representació gràfica MECHa graus III-IV .....	137
Figura 35: Representació gràfica de variables clíniques en funció dels genotips CTLA-4 dels donants.....	139
Figura 36: Representació gràfica de la MRT en presència o absència de la disparitat HY en funció dels genotips dels SNPs de CTLA-4 .....	141
Figura 37: Representació gràfica MECHa graus II, III o IV en l'estudi de l'efecte de l' haplotip CTLA-4 davant de disparitats conegudes.....	142
Figura 38: Representació gràfica MECHa graus III o IV en l'estudi de l'efecte de l' haplotip CTLA-4 davant de disparitats conegudes.....	143
Figura 39: Representació gràfica de la influència del genotip +49 del donant post-al·lo-TPH-CD34 en MECHa III-IV .....	148
Figura 40: Representació gràfica de la SG post-al·lo-TPH-CD34 en funció del genotip CT60 del donant.....	150
Figura 41: Representació gràfica de la supervivència lliure de malaltia en funció del genotip CT60 del donant .....	152
Figura 42: Representació gràfica de l'impacte dels SNPs de CTLA-4 en recidives .....	154
Figura 43: Representació gràfica de MRT en funció dels genotips CT60 i +49 .....	156

# Índex

---

*“La millor estructura no garanteix els resultats ni el rendiment. Però l’estructura equivocada es garantia de fracàs”*

*Peter Drucker*



<b>DEDICATÒRIA I AGRAÏMENTS</b>	<b>I</b>
<b>PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDEX D'ABREVIATURES</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDEX DE TAULES I FIGURES</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDEX</b>	<b>XXI</b>
<b>RESUM</b>	<b>1</b>
<b>SUMARIO</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>11</b>
<b>I-HEMATOPOESI</b>	<b>13</b>
I.1 ONTOGÈNIA DELS PROGENITORS HEMATOPOÈTICS	13
I.2 PROCESSOS DE MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS HEMATOPOÈTIQUES	15
I.2.1 Granulomonopoesi	15
I.2.2 Eritropoesi	16
I.2.3 Megacariopoesi	16
I.2.4 Limfopoesi	16
I.2.4.1 Cèl·lules B	16
I.2.4.2 Cèl·lules T	16
<b>II-TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS</b>	<b>19</b>
II.1 REVISIÓ HISTÒRICA DEL TRASPLANTAMENT DE CÈL·LULES MARE	19
II.3 TIPUS DE TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS	21
II.3.1 Tipus de TPH segons la procedència dels PH	21
II.3.1.1 Moll d'os (MO)	21
II.3.1.2 Sang perifèrica (SP)	21
II.3.1.3 Sang de cordó umbilical (SCU)	23
II.3.1.4 Fetge fetal	24
II.3.2 Tipus de TPH segons el donant	24

II.3.2.1	Trasplantament autogènic, autòleg o autotrasplantament de progenitors hematopoètics (auto-TPH)	24
II.3.2.2	Trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (al·lo-TPH)	24
II.3.2.3	Trasplantament singènic o isogènic de progenitors hematopoètics	26
II.3.2.4	Trasplantament xenogènic	26
II.3.3	Tipus de TPH segons la preparació del pacient	26
II.3.3.1	Acondicionament mieloablatiu	26
II.3.3.2	Acondicionament no mieloablatiu, d'intensitat reduïda o mini-trasplantament	27
II.3.4	Tipus de TPH segons la preparació de l'empelt	28
II.4	EFFECTES COL·LATERALS DEL TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS	28
	<b>III-MALALTIA D'EMPELT CONTRA L'HOSTE</b>	<b>30</b>
III.1	MECH AGUDA	31
III.1.1	Patogènesi de la malaltia d'empelt contra l'hoste aguda (MECHa)	31
III.1.1.1	Activació de les CPAs	33
III.1.1.2	Activació de les cèl·lules T del donant	33
III.1.1.3	Fase efectora cel·lular i inflammatòria: destrucció tissular	34
III.1.2	Gradació clínica de la MECHa	34
III.2	MECH CRÒNICA	35
	<b>IV-IMMUNOBIOLOGIA DE L'AL·LORECONeixEMENT</b>	<b>37</b>
IV.1	PRESENTACIÓ DE L'ANTIGEN	37
IV.1.1	Cèl·lules presentadores d'antigen (CPA)	37
IV.1.2	Molècules HLA	38
IV.1.2.1	Tipus de molècules HLA	39
IV.1.2.2	Nomenclatura de les molècules HLA	42
IV.1.2.3	Herència de les molècules HLA	44



IV.2 PROCESSAMENT DE L'ANTIGEN	44
IV.2.1 Via endògena de processament antigènic	44
IV.2.1 Via exògena de processament de l'antigen	46
IV.3 RECONeixEMENT ANTIGÈNIC-ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA	47
IV.3.1 Sinapsis immunològica – Activació dels limfòcits T	48
IV.3.1.1 Molècula coestimuladora CD28	49
IV.3.1.2 Altres molècules de coestimulació	51
IV.3.2 Sinapsis immunològica – Inhibició dels limfòcits T	53
IV.3.2.1 Molècula inhibidora CTLA-4	53
IV.2.2 Molècula inhibidora PD-1	56
IV.3.2.1 Altres molècules d'inhibició limfocitària	57
<b>V-POLIMORFISMES GENÈTICS IMPLICATS EN L'APARICIÓ DE LA MALALTIA D'EMPELT CONTRA L'HOSTE</b>	<b>58</b>
V.1 ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT	59
V.1.1 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-1	62
V.1.2 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-2	63
V.1.3 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-8	64
V.1.4 Antigen menor d'histocompatibilitat: UTA2-1	65
V.1.5 Antígens menors d'histocompatibilitat: HY	65
V.2 CTLA-4: CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ASSOCIATED PROTEIN-4	66
V.2.1 Polimorfismes genètics de CTLA-4	67
V.3 ALTRES POLIMORFISMES ASSOCIATS A L'APARICIÓ DE MECH	68
<b><u>HIPÒTESI I OBJECTIUS</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>73</b>
OBJECTIUS PRINCIPALS	73
OBJECTIUS SECUNDARIS	73
<b><u>MATERIALS I MÈTODES</u></b>	<b><u>75</u></b>

<b>I-ESTRUCTURACIÓ DEL TREBALL</b>	<b>77</b>
<b>II-POBLACIÓ D'ESTUDI</b>	<b>78</b>
II.1 ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT VEHICULITZATS PER MOLÈCULES HLA-A*02:01	78
II.2 IMMUNOMODULACIÓ DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES	80
II.3 POLIMORFISMES DE CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIO DE CÈL·LULES T	80
<b>III-MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA</b>	<b>83</b>
III.1 OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE SANG TOTAL O MOLL D'OS	83
III.2 OBTENCIÓ DE PELLETS CEL·LULARS	84
III.3 AMPLIFICACIÓ DE DNA GENÒMIC SENCER	84
III.4 QUANTIFICACIÓ, I DETERMINACIÓ DE PURESA I INTEGRITAT DEL DNA	85
III.5 ELECTROFORESI DEL DNA EN GEL D'AGAROSA	86
<b>IV-GENOTIPAT DELS AgSMH</b>	<b>87</b>
IV.1 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	87
IV.2 PCR-SSP	88
IV.2.1 PCR-SSP per HA-1	89
IV.2.2 PCR-SSP per HA-2	90
IV.2.3 PCR-SSP per HA-8	91
IV.3 DISCRIMINACIÓ AL·LÈLICA MITJANÇANT PCR A TEMPS REAL	92
IV.3.1 Interpretació de resultats	93
IV.3.2 Discriminació al·lèlica de HA-1	94
IV.3.3 Discriminació al·lèlica de HA-8	94
IV.3.4 Discriminació al·lèlica de UTA2-1	94
IV.4 SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA PER ELECTROFORESI EN CAPIL·LAR	95
<b>V-GENOTIPAT DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4</b>	<b>96</b>

V.1 GENOTIPACIÓ MITJANÇANT PCR-RFLP	96
V.1.1 PCR-RFLP de CT60	96
V.1.2 PCR-RFLP de +49	97
V.2 DISCRIMINACIÓ AL·LÈLICA DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4	97
V.2.1 Discriminació al·lèlica de CT60	97
V.2.2 Discriminació al·lèlica de +49	97
<b>VI-ANÀLISI ESTADÍSTIC</b>	<b>98</b>
VI.1 FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES	98
VI.2 HOMOGENEÏTAT ENTRE GRUPS	98
VI.3 ANÀLISI UNIVARIANT	98
VI.4 ANÀLISI MULTIVARIANT	99
VI.5 PODER ESTADÍSTIC	99
<b>RESULTATS</b>	<b>101</b>
<b>I- ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT</b>	<b>103</b>
I.1 VALIDACIÓ DE LA METODOLOGIA PROPOSADA PER SPIERINGS I COL·LABORADORS	103
I.2 FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DELS AGSMH HA-1, HA-2, HA-8 , I UTA2-1 EN PARELLES DE DONANT I RECEPTOR	103
I.3 FREQÜÈNCIA DE LES DISPARITATS HA-1, HA-2, HA-8 I UTA2-1 ENTRE DONANTS I RECEPTORS	104
I.4 EFECTE DE LES DISPARITATS ENTRE DONANT I RECEPTOR DE CADASCUN DELS AGSMH EN QUANT A EVOLUCIÓ CLÍNICA DELS PACIENTS POST AL·LO-HSCT	106
I.4.1 Homogeneïtat dels grups d'estudi	106
I.4.2 Anàlisi individual dels antígens menors d'histocompatibilitat	111
I.4.2.1 Influència de les disparitats en AgsmH en MECH aguda graus II-IV	111
I.4.2.2 Influència de les disparitats en AgsmH en MECH aguda graus III-IV	113

I.4.2.3	Influència de les disparitats en AgsmH en MECH crònica	115
I.4.2.4	Influència de les disparitats en AgsmH en altres variables clíniques	116
I.5	ANÀLISI DE L'EFECTE ACUMULATIU DE LES DISPARITATS ENTRE DONANT I RECEPTOR DELS AGSMH EN QUANT A EVOLUCIÓ CLÍNICA	124
I.5.1	Anàlisi de l'efecte d' almenys una disparitat en AgsmH en el resultat clínic post-al·lo-TPH	125
I.5.2	Anàlisi de l'efecte acumulatiu de disparitats amb impacte directe en MECH aguda	128
<b>II-</b>	<b>MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA SEGONS EL GENOTIP CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES</b>	<b>131</b>
II.1	DETERMINACIÓ DE LES FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 EN ELS DONANTS	131
II.2	DETERMINACIÓ DE LA MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA DELS LIMFÒCITS T DEL DONANT SEGONS ELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES EN AGMH	132
I.2.1	Estudi d'homogeneïtat de la població	133
II.2.2	Impacte de la modulació de la resposta al·logènica davant les disparitats en els AgsmH mediada pels polimorfismes CTLA-4 del donant en MECH	134
II.2.2.1	Impacte en MECH aguda	135
II.2.2.2	Impacte en MECH crònica	138
II.2.3	Impacte de la modulació de la resposta al·logènica davant les disparitats en els AgsmH mediada pels polimorfismes CTLA-4 del donant en altres variables clíniques	139
II.2.4	Resultat clínic post-al·lo-TPH associat a les disparitats en AgsmH en funció de l'haplotip CTLA-4	142
<b>III-</b>	<b>IMPACTE DELS POLIMORFISMES CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ T</b>	<b>145</b>
III.1	AVALUACIÓ DE LA INFLUÈNCIA DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DEL DONANT EN EL RESULTAT CLÍNIC POST AL·LO-TPH AMB DEPLECIÓ DE CÈL·LULES T	145
III.1.1	Estudi d'homogeneïtat de la població	146
III.1.2	Influència dels polimorfismes de CTLA-4 en MECH	147
III.1.2.1	Impacte en MECH aguda	147
III.1.2.2	Impacte en MECH crònica	148

III.1.3 Influència dels polimorfismes de CTLA-4 en altres variables clíniques	148
III.1.3.1 Impacte en supervivència global	148
III.1.3.2 Impacte en supervivència lliure de malaltia	151
III.1.3.3 Impacte en recidives	153
III.1.3.4 Impacte en mort relacionada amb el trasplantament	155
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>159</b>
<b>LIMITACIONS DE L'ESTUDI</b>	<b>161</b>
<b>APARTAT 1: ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT</b>	<b>162</b>
FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DE LES DISPARITATS EN ELS AGSMH ESTUDIATS	162
IMPACTE DE LES DISPARITATS ANTIGÈNIQUES EN EL RESULTAT CLÍNIC DE L'AL·LO-TPH	164
INTERÈS CLÍNIC	169
<b>APARTAT 2: MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA SEGONS EL GENOTIP CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES</b>	<b>170</b>
FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DE LES DISPARITATS EN ELS POLIMORFISMES CT60 I +49 DE CTLA-4	170
<b>INFLUÈNCIA DEL GENOTIP CTLA-4 DEL DONANT EN LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES POST-AL·LO-TPH</b>	<b>170</b>
INTERÈS CLÍNIC	172
<b>APARTAT 3: IMPACTE DELS POLIMORFISMES CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ T</b>	<b>173</b>
INTERÈS CLÍNIC	174
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>179</b>
<b>ANNEX I</b>	<b>203</b>
<b>ANNEX II</b>	<b>201</b>



# Resum

---

*“Tot s’hauria de fer el més simple possible, però no més senzill”*

*Albert Einstein*





Els antígens menors d'histocompatibilitat (AgsMH) són pèptids precedents de proteïnes polimòrfiques endògenes que poden ser reconegudes en un context al·logènic pels limfòcits T del donant, donant lloc al desenvolupament de malaltia d'empelt contra l'hoste (MECH); tot i així, la correlació entre els AgsMH i l'aparició d'aquesta complicació és encara tema de debat. Els polimorfismes del gen CTLA-4, han estat relacionats amb malalties autoimmunitàries, predisposició a recaigudes de leucèmies, i amb MECH i recidives post-trasplantament de progenitors hematopoètics (al·lo-TPH). No existeixen estudis que investiguin si aquests polimorfismes podrien estar modulant les respostes del sistema immunitari en presència d'un antigen específic, i tampoc existeixen estudis en relació a l'efecte dels polimorfismes de CTLA-4 en al·loreconeixement quan l'al·lo-TPH és a partir d'un empelt amb depleció exhaustiva de cèl·lules T mitjançant selecció positiva de CD34 (al·lo-TPH-CD34), on la resposta immunitària dependrà de les noves cèl·lules T generades a partir de les cèl·lules mare infoses. La hipòtesi del present treball és que les disparitats en antígens menors d'histocompatibilitat tenen un impacte en el resultat clínic de trasplantament al·logènic a partir d'un germà HLA-idèntic; i que el genotip de CTLA-4 dels limfòcits T del donant podrien estar modulant la resposta immunitària davant d'aquestes disparitats, inclús, quan el pacient rep un empelt lliure de limfòcits T per selecció positiva de CD34.

En el present treball s'ha determinat la incidència de MECH aguda/crònica i altres variables clíniques en una població suficientment àmplia, sotmesa a al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic; així com l'efecte acumulatiu. S'ha avaluat el risc de desenvolupar MECH aguda en funció del genotip dels polimorfismes de CTLA-4 davant de disparitats conegudes, comparant els pacients sotmesos a al·lo-TPH amb donants de genotip homozigot per A dels polimorfismes de CTLA-4 amb els pacients amb donants homozigots per G o heterozigots. S'ha estudiat el paper dels polimorfismes de CTLA-4 del donant en pacients sotmesos a al·lo-TPH-CD34, comparant els pacients amb donants de genotip homozigot per A de CTLA-4 amb els pacients amb donants de genotip AG/GG dels polimorfismes de CTLA-4.

Els resultats obtinguts mostren que, en presència de disparitat de sexe o HA-1 entre donant i receptor incrementa la incidència de MECHa graus II-IV (p: 0.012; hazard ratio [HR]: 1.35; 95% interval de confiança [IC]:1.06-1.70; p: 0.015, HR: 1.572, 95%IC: 1.09-2.26, respectivament). Quan existeix disparitat HY la incidència de MECHa graus III-IV és més elevada (p: 0.008, HR: 1.70, 95%IC: 1.15-2.49), s'associa també amb una pitjor SG (p: 0.006, HR: 1.33, 95%IC:1.08-

1.62), amb una menor SLM (p: 0.031, HR: 1.234, 95%IC: 1.10-1.49) i amb una major MRT (p<0.001, HR: 2.03, 95%IC: 1.53-2.69).

La incidència de MECH aguda graus II, III o IV és més elevada en presència de disparitats HA-1 o HY quan el donant presenta genotip +49AA (p: 0.005, HR: 2.15, 95%IC: 1.27-3.75 and p: 0.025, HR: 1.50, 95%IC: 1.05-2.15, respectivament), mentre que les mateixes disparitats no mostren cap influència en el risc de MECH aguda, quan el donant presenta genotip +49AG/GG. La presència de disparitat HA-8 o HY s'associa a un major risc de desenvolupament de MECHa III-IV davant del genotip +49AA del donant (p: 0.003, HR: 2.11, 95%IC: 1.106-4.18 and p: 0.013, HR: 1.96, 95%IC: 1.15-3.32, respectivament), mentre que no s'observa aquesta associació quan el donant presenta genotip +49AG/GG. En el context de depleció de cèl·lules T, la SG és pitjor per aquells pacients que reben l'empelt a partir d'un donant amb genotip CT60AA que els que el reben a partir d'un donant CT60AG/GG (p: 0.008; HR: 2.24, 95%IC: 1.23-4.08). El genotip CT60AA del donant s'associa també amb una menor SLM, que podria estar relacionada amb l'increment de la incidència de recidives (p: 0.001; HR: 3.41, 95% IC: 1.67-6.96) i amb la tendència amb una major MRT. Aquestes associacions es fan més fortes quan s'homogeneïtza la població en funció de fase precoç de la malaltia.

Els resultats obtinguts suggereixen que el risc d'increment de MECHa associat a disparitats en AgsmH està influenciat pel genotip CTLA-4 del donant. Aquesta observació aporta informació pel millor enteniment del reconeixement immunitari en base de la predisposició genètica de les cèl·lules T del donant pel desenvolupament de respostes immunitàries, i no només en base a la presència d'una disparitat específica. Els resultats obtinguts en el context de depleció T, suggereixen que l'efecte d'empelt contra leucèmia després d'un al·lo-TPH-CD34 està condicionat pel genotip CTLA-4 del donant.

# Sumario

---

*“Todo debería hacerse lo más simple posible, pero no  
más sencillo”*

*Albert Einstein*



Los antígenos menores de histiocompatibilidad (Ags<sub>m</sub>H) son péptidos procedentes de proteínas polimórficas endógenas que pueden ser reconocidas en un contexto alogénico, por los linfocitos T del donante, dando lugar al desarrollo de enfermedad de injerto contra el huésped (EICH); aún así, la correlación entre los Ags<sub>m</sub>H y la aparición de esta complicación es todavía tema de debate. Los polimorfismos del gen CTLA-4, han sido relacionados con enfermedades autoinmunes, predisposición a recaídas de leucemias y con EICH y recidivas post- trasplante de progenitores hematopoyéticos de tipo alogénico (alo-TPH). No existen estudios que investiguen si estos polimorfismos podrían estar modulando las respuestas del sistema inmune en presencia de un antígeno específico, y tampoco existen estudios en relación al efecto de los polimorfismos de CTLA-4 en aloreconocimiento cuando el alo-TPH es a partir de un injerto con depleción exhaustiva de células T mediante selección positiva de CD34 (alo-TPH-CD34), donde la respuesta inmune dependerá de las nuevas células T generadas a partir de las células madre infundidas. La hipótesis del presente trabajo es que las disparidades en Ags<sub>m</sub>H tienen un impacto en el resultado clínico del trasplante alogénico a partir de un hermano HLA-idéntico, y que el genotipo de CTLA-4 de los linfocitos T del donante podrían estar modulando la respuesta inmune frente a estas disparidades, incluso, cuando el paciente recibe un injerto libre de linfocitos T mediante selección positiva de CD34.

En el presente trabajo se determinó la incidencia de EICH aguda/crónica y otras variables clínicas en función de las disparidades en los Ags<sub>m</sub>H, en una población suficientemente amplia sometida a alo-TPH a partir de un hermano HLA-idéntico, así como su efecto acumulativo. Se evaluó el riesgo de desarrollar EICH aguda en función del genotipo de los polimorfismos de CTLA-4 frente a disparidades conocidas, comparando los pacientes sometidos a alo-TPH con donantes de genotipo homocigoto para A de los polimorfismos de CTLA-4, con los pacientes con donantes homocigotos para G o heterocigotos. Se estudió el papel de los polimorfismos de CTLA-4 del donante en pacientes sometidos a alo-TPH, comparando los pacientes con donantes de genotipo homocigoto para A de CTLA-4, con pacientes con donantes de genotipo AG/GG de los polimorfismos de CTLA-4.

Los resultados obtenidos, mostraron que, en presencia de disparidad de sexo o HA-1, incrementa la incidencia de EICHa grados II-IV (p: 0.012; hazard ratio [HR]: 1.35; 95% intervalo de confianza [IC]:1.06-1.70; p: 0.015, HR: 1.572, 95%IC: 1.09-2.26, respectivamente). Cuando existe disparidad HY entre donante y receptor, la incidencia de EICHa grados III-IV es más elevada (p: 0.008, HR: 1.70, 95%IC: 1.15-2.49), se asoció también a una peor SG (p: 0.006, HR: 1.33, 95%IC:1.08-1.62), a una menor SLE (p: 0.031, HR: 1.234, 95%IC: 1.10-1.49) y a una mayor

MRT ( $p < 0.001$ , HR: 2.03, 95%IC: 1.53-2.69). La incidencia de EICHa grados II, III o IV fue mayor en presencia de disparidades HA-1 o HY sólo cuando el genotipo +49 de CTLA-4 del donante fue AA ( $p$ : 0.005, HR: 2.15, 95%IC: 1.27-3.75 and  $p$ : 0.025, HR: 1.50, 95%IC: 1.05-2.15, respectivamente), sin embargo, las mismas disparidades no mostraron ninguna influencia en el riesgo de EICHa, cuando el donante presentó genotipo +49AG/GG de CTLA-4. Los resultados fueron muy similares cuando se estudió HA-8 y HY, la presencia de disparidad en estos AgsmH se asoció a un mayor riesgo de desarrollo de EICHa III-IV cuando el donante presentó genotipo +49AA ( $p$ : 0.003, HR: 2.11, 95%IC: 1.106-4.18 and  $p$ : 0.013, HR: 1.96, 95%IC: 1.15-3.32, respectivamente), no se observó esta asociación cuando el genotipo del donante fue +49AG/GG. En el contexto de depleción T, la SG fue peor en aquellos pacientes que recibieron el injerto a partir de un donante con genotipo CT60AA que los que recibieron un injerto a partir de un donante CT60AG/GG ( $p$ : 0.008; HR: 2.24, 95%IC: 1.23-4.08). El genotipo CT60AA del donante se asoció también a una menor SLM, que podría estar relacionada con el incremento de la incidencia de recidivas ( $p$ : 0.001; HR: 3.41, 95% IC: 1.67-6.96) y con la tendencia de una mayor MRT. Estas asociaciones fueron más fuertes cuando se homogeneizó la población en función de la fase precoz de la enfermedad.

Estos resultados sugieren que el riesgo de incremento de EICHa asociado a disparidades en AgmH está influenciado por el genotipo de CTLA-4 del donante. Esta observación aporta información para el mejor entendimiento del reconocimiento inmunitario en base a la predisposición genética de las células T del donante en el desarrollo de respuestas inmunológicas, y no sólo en base a la presencia de una disparidad específica. Los resultados obtenidos en el contexto de depleción T, sugieren que el efecto de injerto contra leucemia después de un alo-TPH-CD34 viene condicionado por el genotipo CTLA-4 del donante.

# Summary

---

*“Everything should be made as simple as possible, but  
not simpler”*

*Albert Einstein*





Minor histocompatibility antigens (mHAg) are peptides derived from polymorphic intracellular proteins that can be recognized in an allogeneic setting by the donor T-lymphocytes leading to the appearance of graft-versus-host disease (GvHD); however, the correlation between mHAg and this complication is a matter of debate. Polymorphisms on the CTLA-4 gene have been previously associated with autoimmune diseases, predisposition to leukemic relapse, and with GvHD or relapse after allogeneic transplant. There are no studies exploring if these polymorphisms may modulate the ability of the immune system to develop responses in the presence of a specific antigen; and nor studies regarding the effect of CTLA-4 polymorphisms on alloimmune recognition when the allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) is performed with exhaustive T cell depletion through CD34-positive selection (allo- HSCT-CD34), where the immune response will depend on the newly generated T cells from the infused stem. Our hypothesis was that mHAg disparities have an impact in clinical outcome after allo-HSCT from sibling donor; that the CTLA-4 genotype of the donor may modulate the ability of the allogeneic T lymphocytes to respond in front of mHAg mismatches, even when the graft is T cell depleted.

We determined the incidence of acute/chronic GvHD and other clinical variables in the presence of mHAg mismatch in a cohort receiving a HSCT from HLA-identical sibling donor; and also mHAg cumulative effects in clinical outcome. The risk of acute GvHD in front specific mHAg of patients carrying the AA genotype in CTLA-4 polymorphism were compared with the risk among those with donors carrying the AG or GG genotypes. We evaluated the role of CTLA-4 genotype of the donor in patients receiving allo-HSCT with depleted T cells, comparing AA genotypes in CTLA-4 with patients with donors AG/GG genotypes.

Our results shows that when donor and recipient were mismatched for HY or HA-1 the incidence of grades II-IV acute GVHD was higher (p: 0.012; hazard ratio [HR]: 1.35; 95% confidence interval [CI]:1.06-1.70; p: 0.015, HR: 1.572, 95%CI: 1.091-2.264, respectively). When donor and patient were mismatched for HY the incidence of grades III-IV acute GvHD was also higher (p: 0.008, HR: 1.70, 95%CI: 1.15-2.49), sex mismatch was associated with worse overall survival (p: 0.006, HR: 1.33, CI:1.08-1.62), lower disease-free survival (p: 0.031, HR: 1.234, 95%CI: 1.10-1.49) and with major transplant related mortality (p<0.001, HR: 2.03, 95%CI: 1.53-2.69). The incidence of grade II, III or IV acute GvHD was higher when donor and recipient were mismatched for HA-1 or HY only when the donor was genotyped as AA+49 CTLA-4 (p: 0.005, HR: 2.15, 95%CI: 1.27-3.75 and p: 0.025, HR: 1.50, 95%CI: 1.05-2.15 respectively), whereas the same mismatches did not show influence on the risk of acute if the

donor was genotyped as AG or GG +49 CTLA-4. Similarly, the HA-8 or HY mismatches were associated with a higher risk of acute III or IV when the donor was homozygous for the +49 allele (p: 0.003, HR: 2.11, 95%CI: 1.106-4.18 and p: 0.013, HR: 1.96, 95%CI: 1.15-3.32 respectively) but this association was not observed when the donor carried the AG or GG CTLA-4 genotype.

In T cell depleted scenario, overall survival (OS) was worse for those patients who received grafts from a donor with the CT60 AA genotype rather than from a donor with the AG or GG genotype (35.6% vs. 49.4%, p: 0.043). This association was confirmed through multivariate analysis, which identified the donor CT60 genotype as an independent risk factor for OS (p: 0.008; hazard ratio [HR]: 2.24, 95% confidence interval [CI]: 1.23-4.08). The donor CT60 AA genotype was also associated with lower disease-free survival, this being related to an increased risk of relapse (p: 0.001; HR: 3.41, 95% CI: 1.67-6.96) and a trend toward higher transplant-related mortality. These associations were stronger when considering only patients in the early stage of disease.

The results suggest that the risk of acute GvHD associated with mHAg mismatches was influenced by the CTLA- genotype of the donor. This observation provides supporting evidence for enhanced immune recognition on mHAg in bases to the donor's T-cell genetic predisposition to develop immune responses, and not only based in the presence of a specific mismatch. In the T cell depleted scenario, that graft-versus-leukaemia (GvL) activity after T cell depletion is conditioned by the donor CTLA-4 genotype.

# Introducció

---

*"Un camí de mil milles comença amb un pas"*

*Benjamin Franklin*

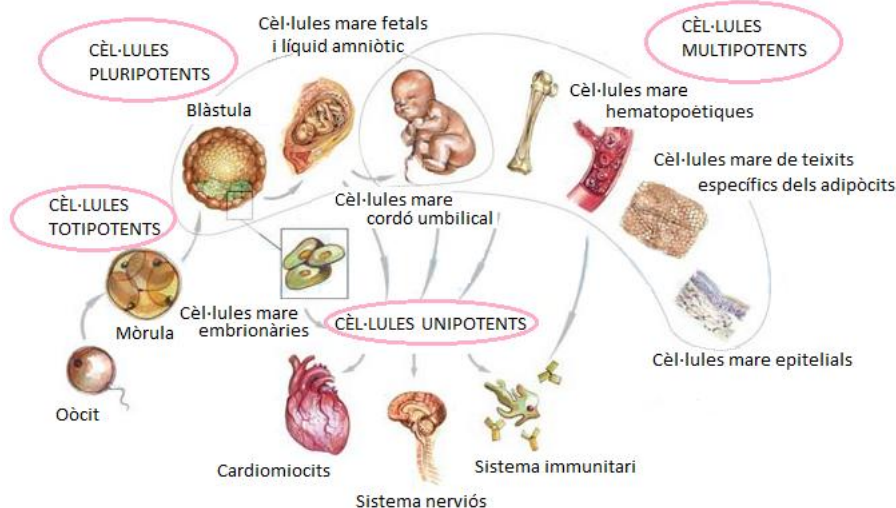


# I-HEMATOPOESI

## I.1 ONTOGÈNIA DELS PROGENITORS HEMATOPOÈTICS

Des del moment que té lloc la fertilització de l'òocit, les cèl·lules es comprometen de manera progressiva, a un tipus cel·lular específic. Les cèl·lules generades a partir de les primeres divisions cel·lulars, reben el nom de "totipotents", doncs tenen la capacitat d'originar un animal complet.

En mamífers, aquesta capacitat es perd en la formació de la blàstula, en la qual es poden distingir tres capes: una capa externa, una capa interna i una massa cel·lular interna, de la qual se'n poden obtenir cèl·lules embrionàries "pluripotents". Durant la gastrulació, s'estableixen tres capes germinals: ectoderm, endoderm i mesoderm, amb el conseqüent grau de compromís cel·lular, el què donarà com a resultat cèl·lules madures amb funcions específiques, amb una vida mitja limitada i baixa capacitat de proliferació. No obstant, no totes les cèl·lules maduren a etapes terminals i és possible trobar cèl·lules "multipotents" en teixits diferenciats, que mantenen la capacitat de proliferació i auto-renovació [1] (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema de l'ontogènia de la cèl·lula mare.

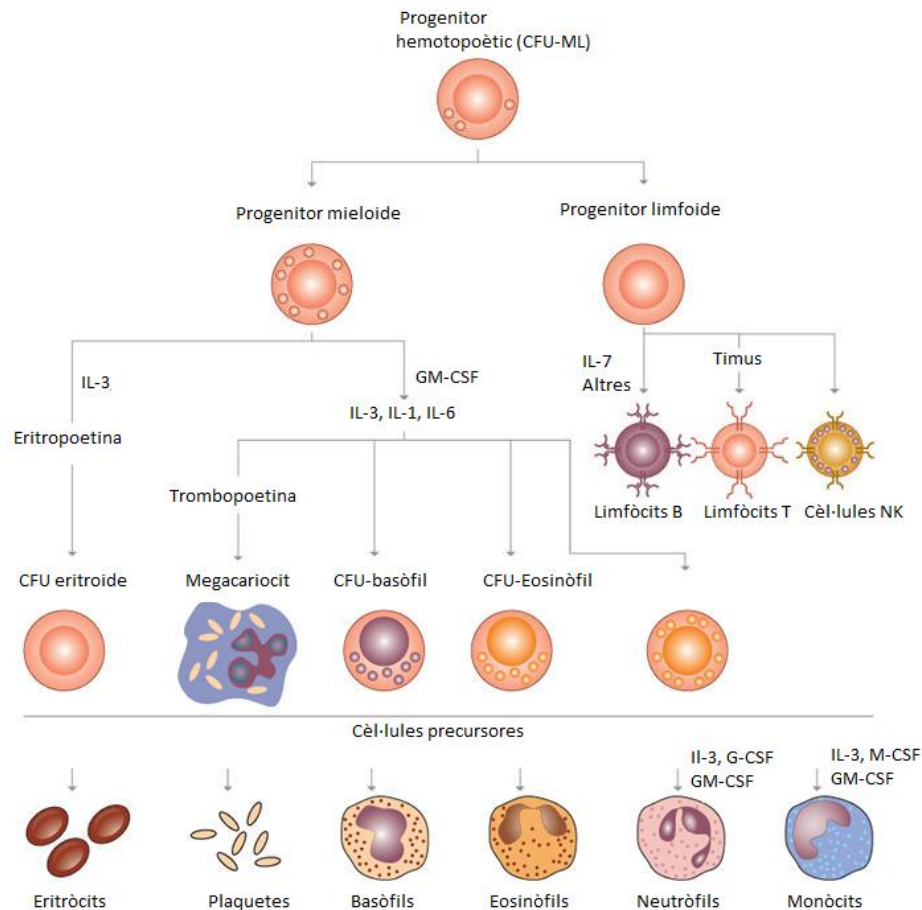
Cèl·lules pluripotents provinents de l'endoderm, mesoderm o ectoderm, originats durant l'embriogènesi, evolucionen cap a teixits específics, cèl·lules diferenciades i cèl·lules mare [2].

Les cèl·lules sanguínies s'originen al moll de l'os mitjançant un procés complex de diferenciació i maduració cel·lular (Figura 2). En aquest procés, anomenat hematopoesi, hi participen diversos factors de maduració en el qual també és fonamental la participació de molècules d'adhesió cel·lular, presents en les cèl·lules hematopoètiques, cèl·lules de l'estroma i en la matriu extracel·lular [1].

El moll de l'os es troba en la cavitat medul·lar dels ossos llargs i en els espais existents entre les trabècules dels ossos esponjosos. Està format pel compartiment vascular i el compartiment hematopoètic. Aquest segon està compost per illots de cèl·lules hematopoètiques de les diferents línies cel·lulars (eritoblàstica, granulocítica, monocítica, limfoide i megacariocítica) en diferents estadis maduratius i cèl·lules de l'estroma medul·lar (macròfags, cèl·lules reticulars i algunes cèl·lules adiposes) que participen activament en el procés de regulació hematopoètica mitjançant secreció de citocines i factors de maduració. Les cèl·lules mare representen menys d'un 1% de les cèl·lules del moll de l'os. Els progenitors hematopoètics (PH), anomenats també unitats formadores de colònies mieloides o limfoides (CFU-ML) donen lloc a dos precursors cel·lulars principals, mieloide i limfoide (Figura 2). Aquests progenitors hematopoètics que existeixen en petites quantitats, es comprometen cap a un llinatge particular de diferenciació i finalment generen cèl·lules madures de la sang. Aquesta seqüència ordenada, permet el manteniment de l'homeòstasi i suplir de manera ràpida i eficient la demanda que es produeix en situacions de dany o estrés fisiològic, com en el cas de pèrdua de sang, infeccions, etc.

Les propietats dels PH fan d'aquestes cèl·lules una eina bàsica pel tractament de diverses malalties.

Entre els mecanismes de control que regulen les cèl·lules mare destaquen: cèl·lules de l'estroma medul·lar, matriu extracel·lular, molècules d'adhesió, citocines i factors de creixement. Tots ells compleixen un paper important en l'especificació del llinatge i la determinació del destí de les cèl·lules precursoras. Depenent del tipus cel·lular que inicia el senyal de diferenciació o del tipus de senyal alliberada, s'iniciarà el desenvolupament d'una línia cel·lular o una altra [1].



**Figura 2:** Esquema de l'hematopoesi

Els progenitors hematopoètics: CFU-ML (unitat formadora de colònies mieloides i limfoides), origen: a) el progenitor mieloide el qual donarà lloc als granulòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils), monòcits, eritròcits i plaquetes; b) el progenitor limfoide, que donarà lloc als limfòcits T i B. Les citocines (IL-X) i els factors estimuladors de colònies específics (X-CSF) participen com a factors reguladors de la granulopoesi i limfopoesi [3].

## I.2 PROCESSOS DE MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS HEMATOPOÈTIQUES

### I.2.1 Granulomonopoesi

Aquest és el procés a través del qual s'originen, diferencien i maduren els granulòcits (eosinòfils, basòfils i neutròfils) i les cèl·lules del sistema fagocític mononuclear (monòcits i macròfags).

Per a l'obtenció de la cèl·lula terminalment diferenciada, són necessaris diferents estadis maduratus, en els quals s'observen les següents característiques citològiques: reducció de la mida cel·lular, adquisició de la granulació específica i segmentació nuclear [1].

### **I.2.2 Eritropoesi**

El procés de maduració de la sèrie eritropoètica que dona lloc als eritròcits, hematies o glòbuls vermells es coneix amb el nom d'eritropoesi. El procés de maduració eritoblàstic es caracteritza per: hemoglobinització progressiva, reducció de la mida nuclear fins a picnosi i expulsió del nucli [1].

### **I.2.3 Megacariopoesi**

Les plaquetes circulants s'originen a partir dels megacariocits del moll de l'os. El procés de maduració megacariocítica es caracteritza per poliploïdia amb gegantisme nuclear i acidificació del citoplasma. Un megacariocit és capaç de produir entre 1000-5000 plaquetes (proporcional a la ploïdia), s'inicien divisions cel·lulars successives sense divisió cel·lular (endomitosi), posteriorment, el nucli i el citoplasma són fagocitats per macròfags propers [1].

### **I.2.4 Limfopoesi**

Les cèl·lules B i T presenten un procés de diferenciació i maduració diferent.

#### **I.2.4.1 Cèl·lules B**

El procés de maduració dels limfòcits B està comprès en dues etapes: una antígen - independent, que té lloc al moll de l'os (considerat òrgan limfàtic primari), i una altra antígen - dependent que té lloc fonamentalment en els òrgans limfoides secundaris (ganglis limfàtics, melsa i altres teixits limfoides), on el limfòcits B entren en contacte amb un determinat antígen tornant-se específics [1].

#### **I.2.4.2 Cèl·lules T**

Es fa més incidència a aquest tipus cel·lular doncs desenvolupen un paper important en el treball d'aquesta tesi.



Els limfòcits T s'originen a moll d'os a partir d'un precursor capaç de migrar cap al timus, el principal òrgan on té lloc la diferenciació dels limfòcits T. Durant el procés de maduració, els limfòcits T reben el nom de timòcits per distingir-los dels limfòcits T madurs circulants. La generació del repertori de receptors limfòcits T es divideix en tres etapes:

- 1) Migració dels precursors dels limfòcits T: Els precursors dels limfòcits T penetren a l'interior del timus gràcies a la presència de receptors d'adhesió en la seva superfície, on mantenen una elevada capacitat de proliferació.
- 2) Diferenciació: Els timòcits avancen cap a capes més internes del timus, mentre van rebent senyals de maduració provinents de cèl·lules epitelials, dendrítiques i macròfags presents en l'òrgan, entre les quals s'ha identificat IL-7 com a modulador directe de la supervivència, diferenciació, transcripció i reajustament del receptor de cèl·lules T (RCT), (veure capítol III.3). Els gens que codifiquen per les molècules del RCT pateixen reordenaments com a part de la maduració dels limfòcits T, cada limfòcit T madur expressa dues cadenes funcionals ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) que juntes defineixen una molècula peculiar de RCT. Dins de la població de cèl·lules T que posseeix un adult sa, existeixen milions de RCT diferents, cadascun dels quals defineix un clon de cèl·lules T i una sola especificitat antigènica [4].

La maduració dels timòcits fins a convertir-se en limfòcits T madurs té lloc en estadis ben diferenciats. Aquests estadis es caracteritzen per canvis a nivell dels gens dels RCT com s'ha comentat anteriorment, per l'expressió de la proteïna d'aquest receptor i per l'expressió d'altres glucoproteïnes de superfície de la cèl·lula T, essencials per a la funció plena del receptor, que són CD4, CD8 i CD3 [4].

En base a l'expressió de CD4 i/o CD8, la població de limfòcits T en un adult es pot dividir en 4 grups: 1) CD4(-) CD8(-): limfòcits T doble negatiu; 2) CD4(+) CD8(+): limfòcits T doble positiu; 3) CD4(+) CD8(-): limfòcits T "helper"; 4) CD4(-) CD8(+): limfòcits T citotòxics.

- 3) Selecció tímica. Abans de l'alliberació de limfòcits T madurs a sang perifèrica, tenen lloc dos processos importants:

- Selecció negativa de limfòcits T: generació de tolerància eliminant o silenciament dels limfòcits T que posseeixen una alta afinitat per antígens (Ags) propis, evitant d'aquesta manera malalties autoimmunes.
- Selecció positiva de limfòcits T: deriva en la generació de limfòcits T madurs amb un RCT capaç de reconèixer el complex major d'histocompatibilitat (CMH).

#### I.2.4.2.1 Funcions efectores dels limfòcits T

Una vegada el RCT ha interaccionat amb l'Ag, l'hagi reconegut com a estrany, i en presència de les senyals de coestimulació necessàries, la cèl·lula T, que es trobava en un estat naïve, passa a convertir-se en una cèl·lula efectora. Les funcions efectores de les cèl·lules T, són les activitats biològiques que capaciten als limfòcits T per a desenvolupar la resposta immunitària útil en front l'Ag.

Les poblacions CD4(+) CD8(-), limfòcits T "helper", tenen com a funció principal la producció de citocines, les quals s'alimenten retroactivament amplificant la senyal d'activació, així com sobre altres cèl·lules del sistema immunitari (limfòcits B, macròfags, *natural killer* (NK)) i sobre cèl·lules de l'endoteli vascular, per permeabilitzar-lo i afavorir l'extravasació de més leucòcits a la zona de reconeixement antigènic.

Les poblacions CD4(-) CD8(+), limfòcits T citotòxics, tot i que també secreten citocines, ho fan més discretament, ja que la seva principal funció és dur a terme la lisi de les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) que han iniciat la senyal d'activació. La mort de la cèl·lula diana es dona per apoptosi o per lisi osmòtica mediada pels complexos granzima-perforina. Com a resultat de l'activitat citolítica i de l'alliberació de citocines, els limfòcits T provoquen una inflamació selectiva de la zona d'actuació, i com a conseqüència, provoquen dany tissular [5].

El millor coneixement dels mecanismes cel·lulars i moleculars que regulen l'autorenovació i diferenciació dels PH ha permès profunditzar sobre la biologia d'aquest tipus cel·lular. Associat a això, s'ha visualitzat la opció del seu ús en òrgans danyats amb pèrdua de la funcionalitat, mitjançant el transplantament de progenitors hematopoètics.

# II-TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS

## II.1 REVISIÓ HISTÒRICA DEL TRASPLANTAMENT DE CÈL·LULES MARE

Els inicis del trasplantament de moll d'os remunten als anys 40, arrel de l'observació dels efectes hematològics produïts per l'exposició a la radiació en els supervivents de la Segona Guerra Mundial.

Al 1949, *Jacobson* i col·laboradors van veure que protegir amb plom la melsa de ratolins altament irradiats, en permetia la supervivència. Poc després, *Lorenz* i col·laboradors (1951) van reportar que els ratolins recuperaven la capacitat hematopoètica si se'ls sotmetia a una transfusió de cèl·lules procedents de la melsa o del moll d'os. Les dades definitives a favor de la reconstitució cel·lular va provenir, al 1956, de l'observació de característiques citogenètiques de l'empelt provinent de moll d'os de rata, en un ratolí prèviament irradiat letalment [6]. Es van observar precursors eritoblàstics, megacariocítics, granulocítics i algunes cèl·lules de tipus limfoide en el moll d'os i la melsa d'aquests ratolins, totes elles d'origen clonal. Això va posar en evidència l'existència d'una cèl·lula "multipotent" en el moll de l'os, capaç de restablir l'hematopoesi normal i recuperar al ratolí de l'aplàsia produïda per la radiació [6-11].

Els primers trasplantaments de moll d'os a partir d'un donant no emparentat en humans van ser força desencoratjadors, doncs només s'aconseguien empelts transitoris i tots els pacients presentaven complicacions importants [12].

No obstant, va quedar demostrat que quantitats relativament grans de moll d'os podien ser administrades per via intravenosa sense toxicitat i que aquestes aconseguïen repoblar els buits a moll d'os causats per la irradiació i restaurar l'hematopoesi del receptor [13].

Alguns fets rellevants en el desenvolupament del trasplantament de moll d'os van ser, per una banda, el descobriment de les molècules HLA (de l'anglès: "*Human Leukocyte Antigen*") descrites per *Dausset i Payne* al 1958, i per l'altra, l'observació de l'aparició d'una "malaltia

secundària” al realitzar un trasplantament de moll d’os d’un individu a un altre, on els limfòcits infosos del donant desencadenaven una resposta immunitària contra els teixits de l’hoste (*Billingham i Brent, 1959*), el que coneixem avui dia com a malaltia d’empelt contra l’hoste (MECH) [6].

Gràcies a això va ser possible la selecció de donants compatibles que proporcionaven un empelt a llarg termini a l’hora que es minimitzava el risc de complicacions derivades de la incompatibilitat entre donant i receptor. Al 1968, *Gatti* i col·laboradors van reportar el primer trasplantament de moll d’os amb èxit, infòs en un pacient amb immunodeficiències greus a partir d’un germà HLA idèntic. Paral·lelament tenien lloc processos similars (*Bach* i col·laboradors, 1968; *deKoning* i col·laboradors, 1969). Aquests pacients no van requerir teràpies immunosupressores a causa de la seva malaltia de base [6, 14-16].

Els grans avenços en el coneixement de l’ontogènia dels progenitors hematopoètics, el desenvolupament de mètodes per a la seva recol·lecció, expansió, manipulació in vitro, criopreservació i trasplantament, així com el perfeccionament de la pràctica clínica i l’aparició de fàrmacs immunosupressors, va permetre al trasplantament de moll d’os deixar de ser un tractament d’últim recurs, administrat únicament a pacients en fases terminals, per convertir-se en una teràpia efectiva per aquells pacients amb diverses malalties hematològiques congènites o adquirides.

El fet de que actualment es disposi de fonts tan diverses de recol·lecció: sang perifèrica degudament estimulada, sang de cordó umbilical i moll d’os, ha obligat a un canvi de terminologia desplaçant trasplantament de moll d’os (degut a que aquesta era la única font de recol·lecció de cèl·lules mare) per trasplantament de progenitors hematopoètics (TPH) [17].

Així doncs, en l’actualitat, el TPH té com a objectius substituir l’hematopoesi del pacient per ser total o parcialment defectuosa, insuficient o neoplàsica; o bé permetre un tractament anti-neoplàsic en dosis molt elevades, que originaria mielodepressió prolongada o definitiva. A més, en un TPH a partir d’un donant sa, la cel·lularitat immunocompetent derivada de l’empelt és capaç de contribuir a l’efecte antitumoral. Aquest efecte es coneix com a empelt contra la neoplàsia, habitualment contra leucèmia (ECL) [17].

No obstant, tot i ser efectiu en el tractament d’aquestes malalties, el TPH segueix comportant alguns riscos i complicacions que poden arribar a comprometre la vida dels pacients.

L'existència de fenòmens al·loreactius que puguin desencadenar l'aparició de la malaltia d'empelt contra l'hoste i els processos infecciosos derivats de la gran immunosupressió a la que es sotmeten els receptors, són alguns dels factors que augmenten les complicacions després d'un TPH al·logènic.

Durant les quatre últimes dècades els esforços s'han centrat en l'elucidació dels processos biològics i al·loreactius que tenen lloc en pacients que han estat sotmesos a un TPH, així com en la millora de la pràctica clínica i en el maneig dels pacients que s'hi han de sotmetre, amb una notable reducció de la morbiditat i mortalitat associades a aquest procediment.

### **II.3 TIPUS DE TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS**

Existeixen diferents modalitats de TPH segons la relació entre donant i receptor, la font de progenitors utilitzada, tipus d'acondicionament que reben els pacients i la manipulació de l'inòcul prèvia a la infusió. Escollir-ne un o altre depèn de varis factors.

#### **II.3.1 Tipus de TPH segons la procedència dels PH**

##### **II.3.1.1 Moll d'os (MO)**

Inicialment la font de recollida de PH va ser el MO per ser un teixit molt ric en cèl·lules progenitores.

La finalitat de l'aspiració medul·lar és obtenir un nombre d'entre  $2 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  cèl·lules nucleades medul·lars/Kg del receptor.

Els PH s'obtenen mitjançant diverses puncions de les crestes ilíiaques posteriors, anteriors, i ocasionalment, estèrnum o meseta tibial. Els inconvenients principals són que l'aspiració es realitza a quiròfan i sota anestèsia total; els efectes secundaris solen ser dolor en les zones de punció i els efectes de l'anestèsia [18].

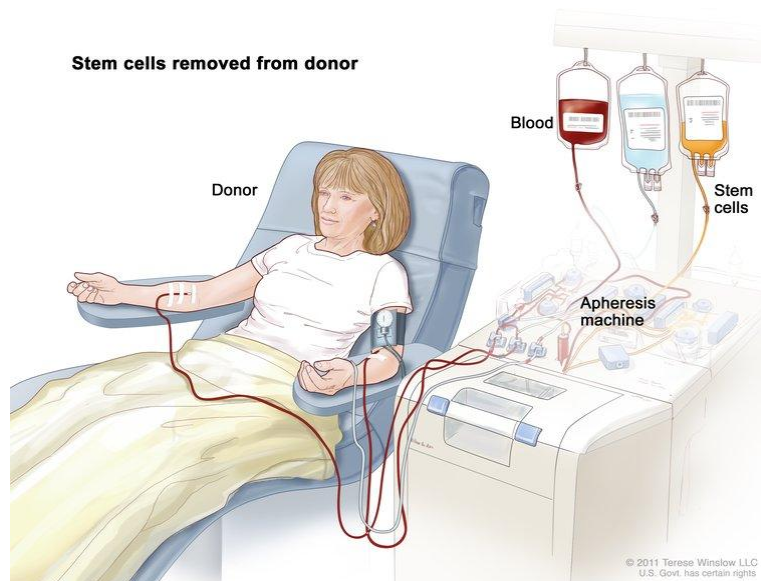
##### **II.3.1.2 Sang perifèrica (SP)**

L'ús de la SP com a font de PH s'ha generalitzat en els últims anys pels seus múltiples avantatges. Els PH s'obtenen mitjançant puncions venoses o catèters centrals, no requereix anestèsia, el número de PH sol ser major que els obtinguts amb aspirat medul·lar,

l'hematopoesi és restaurada amb menys temps i l'empelt té baixa probabilitat de contaminació neoplàsica en cas de TPH.

La facilitat pel què fa a la obtenció de PH a partir d'aquesta font (leucoafèresi: Figura 3), el baix risc que suposa pel donant, així com la disminució en la mortalitat relacionada amb el trasplantament (MRT) en pacients amb malaltia avançada, han afavorit que, des de que Schmitz i col·laboradors, al 1995, realitzessin el primer al·lo-TPH amb progenitors obtinguts de SP, l'ús d'aquesta font s'hagi incrementat de forma exponencial [18].

En contrapartida, requereix un alt coneixement de les tècniques vinculades a la mobilització i recol·lecció de PH. A més, en SP, els PH es troben en concentracions molt baixes, de manera que cal l'administració de citocines al donant, que indueixen la mobilització dels PH cap a SP. Per a la recol·lecció són necessaris l'ús de separadors cel·lulars, i s'ha de considerar que el producte final està sempre molt contaminat per limfòcits madurs [18].



**Figura 3:** Dibuix que representa la leucoafèresi

Procés a través del qual s'obtenen els progenitors hematopoètics. Els PH són mobilitzats de moll d'os a sang perifèrica pel subministrament de G-CSF (factor estimador de colònies granulocítiques). S'extreu la sang per via venosa d'un dels dos braços, aquesta passa per la màquina d'afèresi, que recull el producte de la mobilització, i es retorna al donant també via intravenosa per l'altre braç [19].

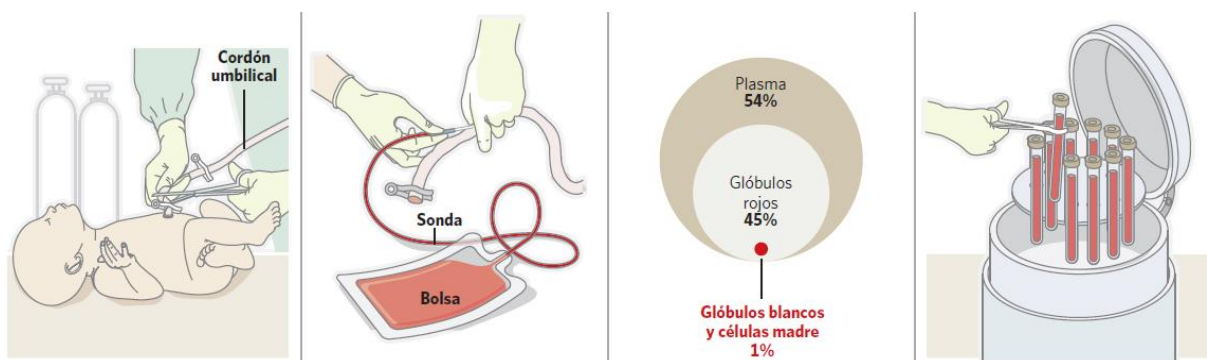
### II.3.1.3 Sang de cordó umbilical (SCU)

El desenvolupament del sistema hematopoètic s'inicia de manera precoç en el període embrionari en la zona pre-aòrtica i el sac vitel·lí, i immediatament després s'estableix al fetge fetal. A finals del segon trimestre, el sistema hematopoètic colonitza el moll de l'os. No obstant, en les fases finals del desenvolupament fetal encara persisteix una circulació activa de PH, i una quantitat apreciable d'aquests poden ser extrets dels vasos fetals de la placenta a través del cordó umbilical.

Els PH es recullen per punció de la vena umbilical immediatament després del part (Figura 4). S'obtenen de 70 a 120 ml de sang que contenen els PH.

Les avantatges principals d'aquesta font de PH són la facilitat d'obtenció i la seva poca maduració respecte als PH d'un adult, la qual cosa fa que el trasplantament sigui menys restrictiu en quant a la compatibilitat HLA (de l'anglès "*human leukocyte antigen*") [18].

El principal inconvenient d'aquests PH, és que tot i l'elevada concentració de cèl·lules, el volum és molt petit, per la qual cosa la quantitat total de cèl·lules obtingudes no és suficient per a un receptor adult amb un volum corporal elevat; així com que no es disposaria d'un segon empelt en cas de que fallés l'inicial. Per tant, aquesta font de progenitors queda limitada a nens i als adults que disposin d'una unitat de sang de cordó amb cel·lularitat suficient pel seu pes corporal.



**Figura 4:** Representació esquemàtica del procés d'obtenció de progenitors hematopoètics a partir de sang de cordó umbilical

En el moment del part, un cop el nadó ha nascut, s'apliquen dos clamps al cordó i es talla entre ells per separar al nounat. S'insereix una agulla al cordó i la sang és recol·lectada en una bossa. Aquesta és

enviada al laboratori, on s'obtenen els leucòcits i progenitors hematopoètics, i s'emmagatzemen en nitrogen líquid (-196°C) fins al moment del seu ús [20].

#### **II.3.1.4 Fetge fetal**

Tot i que actualment aquesta font no s'utilitza, al fetge fetal hi ha l'establiment del inici del sistema hematopoètic durant el període embrionari, per tant és una font rica de PH.

L'obtenció de PH en aquest cas és resultant de la disgregació del fetge de fetus procedents d'avortaments fins a obtenir suspensions cel·lulars que inclouen els progenitors.

### **II.3.2 Tipus de TPH segons el donant**

#### **II.3.2.1 Trasplantament autogènic, autòleg o autotrasplantament de progenitors hematopoètics (auto-TPH)**

Els progenitors hematopoètics són obtinguts del propi pacient, amb anterioritat al tractament de mieloablació d'acondicionament pre-trasplantament [17]. L'edat límit per a la realització d'un auto-TPH és de 70 anys [6]. No es produeix MECH, però tampoc es dona l'efecte d'empelt contra leucèmia, pel què la taxa de recaigudes és més elevada.

Aquest tipus de TPH estan indicats en el tractament de malalties adquirides de tipus neoplàsic: leucèmies, limfomes no Hodgkinians, malaltia de Hodgkin, mieloma múltiple, histiocitosis, amiloïdosis, alguns tumors sòlids; també s'ha aplicat auto-TPH a malalties autoimmunes [17].

#### **II.3.2.2 Trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (al·lo-TPH)**

Es defineix com el procediment mitjançant el qual un pacient rep els progenitors hematopoètics procedents d'un individu de la mateixa espècie.

L'avantatge principal d'aquest tipus de TPH és el seu potencial curatiu basat en l'activitat immunoterapèutica dels limfòcits T al·logènics trasplantats, capaços de reconèixer antígens tumorals i desencadenar respostes contra ells [21], [22].



Tot i així, la presència de cèl·lules al·logèniques immunocompetents en l' inòcul, fan de l'al·lo-TPH un procés complex que s'associa freqüentment a complicacions, com l'aparició de MECH i la fallada de l'empelt, que poden arribar a comprometre la vida del pacient. Per aquesta raó, i per intentar minimitzar al màxim les incompatibilitats entre donant i receptor, el donant escollit sol ser un familiar, normalment un germà HLA compatible.

Per aquells pacients en què la millor opció és un trasplantament al·logènic i no tenen un germà compatible, cal buscar un donant alternatiu. Existeixen tres opcions:

- 1) Donant familiar haploidèntic: és aquell trasplantament en el qual donant i receptor comparteixen identitat genotípica per un haplotip HLA, mentre que l'altre haplotip pot diferir en una o més posicions gèniques [17]. Tradicionalment s'ha associat a un alt índex de complicacions (MECH, infeccions) però recentment s'ha descrit un millor resultat amb l'ús de ciclofosfamida post-TPH [23, 24].
- 2) Recórrer a un donant no emparentat (DNE): l'ús d'aquest tipus de trasplantament ha permès que molts pacients sense familiars compatibles puguin beneficiar-se d'un TPH. Tot i així, les sèries analitzades retrospectivament l'associen a majors complicacions post-trasplantament que un al·lo-TPH a partir d'un HLA-idèntic.

Aquest fet pot ser degut a que anteriorment, la tipificació al·lèlica dels loci HLA es realitzava utilitzant tècniques de baixa resolució, de manera que era freqüent que la presència de determinades disparitats quedessin ocultes, les quals podien desencadenar fenòmens al·loreactius de gran intensitat. Avui dia, la tipificació dels loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR i HLA-DQB1 es realitza mitjançant tècniques d'elevada resolució per la qual cosa aquestes disparitats no passen inadvertides.

- 3) Sang de cordó umbilical (SCU): Com s'ha comentat anteriorment, la sang de cordó umbilical conté de manera natural una gran quantitat de cèl·lules mare que poden ser utilitzades pel trasplantament.

Els al·lo-TPH estan indicats en el tractament de neoplàsies hematopoètiques d'alt risc: en primera línia: leucèmies mieloides agudes d'alt risc i síndromes mielodisplàstiques; en segona línia: leucèmia limfàtica aguda, limfomes recaiguts, malaltia de Hodgkin i mieloma múltiple. També s'utilitza en el tractament d'insuficiències medul·lars (aplàsia medul·lar greu i

hemoglobinúria paroxística nocturna) i malalties congènites, com immunodeficiència congènita combinada, talassèmia major [17].

### **II.3.2.3 Trasplantament singènic o isogènic de progenitors hematopoètics**

En aquest tipus de trasplantament, donant i receptor són bessons univitel·lins, de manera que comparteixen identitat genètica per tots el loci. No existeixen riscos derivats de les incompatibilitats entre donant i receptor, de manera que el trasplantament és, per norma general, ben tolerat, tot i que s'ha donat que algun pacient sotmès a aquest tipus de TPH ha desenvolupat MECH [25].

### **II.3.2.4 Trasplantament xenogènic**

Es defineix com el procediment mitjançant el qual un pacient rep els progenitors hematopoètics procedents d'un individu d'una espècie diferent. En termes d'hematologia clínica, no existeixen aquests tipus de intervencions [17].

## **II.3.3 Tipus de TPH segons la preparació del pacient**

Els pacients sotmesos a TPH, reben un acondicionament previ a la infusió de l'empelt amb l'objectiu d'eliminar les cèl·lules hematopoètiques (i tumorals en els TPH per neoplàsies), crear espai medul·lar pel PH que es trasplanten i immunodeprimir al pacient per evitar el rebuig dels PH en els al·lo-TPH. En l'al·lo-TPH es distingeixen dos modalitats d'acondicionament en funció de la intensitat i finalitat del mateix [17, 26].

### **II.3.3.1 Acondicionament mieloablatiu**

L'acondicionament pre-trasplantament s'ha basat tradicionalment en l'administració de quimioteràpia a altes dosis associada o no a radioteràpia. Això es coneix com acondicionament mieloablatiu o convencional. Aquest tipus d'acondicionament té com a objectiu l'eradicació de

les cèl·lules neoplàsiques o, com a mínim, la disminució del grau de la malaltia a un nivell mínim residual, així com la immunosupressió del pacient per facilitar el procés d'empelt i prevenir el rebuig dels PH infosos. La mieloablació s'associa a un elevat grau de morbiditat i mortalitat que alguns pacients, entre ells els que han rebut un trasplantament previ, els que presenten funcions cardíaques, pulmonars o hepàtiques limitades i sobretot aquells d'edat avançada, no són capaços de tolerar. A més, un tractament mieloablatiu pot no ser sempre convenient o no ser necessari en funció de la malaltia a tractar.

### **II.3.3.2 Acondicionament no mieloablatiu, d'intensitat reduïda o mini-trasplantament**

Els bons resultats obtinguts amb la infusió post-trasplantament del limfòcits del donant en el control de la malaltia mínima residual dels pacients, va donar lloc al concepte d'acondicionament d'intensitat reduïda (RIC, de l'anglès "*reduced-intensity conditioned*") [27, 28].

Es va observar que no era necessari "crear un espai" en la medul·la òssia mitjançant l'ús d'agents citoreductors, sinó que perquè les cèl·lules poguessin restablir l'hematopoesi normal era suficient induir un grau d'immunosupressió del pacient [29]. L'ús de RIC previ a l'al·lo-TPH ha demostrat ser efectiu i més ben tolerat: la incidència de mort relacionada amb el trasplantament (MRT) és menor que en els trasplantaments mieloablatus i ofereix una opció terapèutica a pacients en els que l'al·lo-TPH convencional no està recomanat.

El tipus d'acondicionament previ al trasplantament es pautarà en funció de la malaltia a tractar, de l'edat i de la co-morbiditat del pacient. D'aquesta manera els pacients amb alt risc de MRT però de baixa possibilitat de recaiguda, es tractaran generalment amb dosis no mieloablatives, i aquells amb risc de recaure però en els quals s'espera baixa MRT, es tractaran amb dosis convencionals de quimioteràpia i/o radioteràpia.

Un cop realitzar l'acondicionament immunosupressor, es realitza la infusió de l'empelt procedent del donant. Són necessàries entre 2 i 4 setmanes per què aquests comencin a "funcionar" adequadament; podent-se reduir amb l'ús de factors de creixement.

### II.3.4 Tipus de TPH segons la preparació de l'empelt

Generalment, en els trasplantaments a partir d'un donant HLA idèntic (independentment de la font de PH), o els realitzats a partir de SCU, l'inòcul s'infon intacte, sense sotmetre'l a fraccionament cel·lular. Això suposa la coinfusió de limfòcits T del donant, els quals seran responsables de l'expansió de MECH.

El producte a infondre pot ser manipulat amb la intenció d'eliminar els limfòcits T del donant, capaços de reconèixer els antígens desconeguts del receptor. El procés de depleció de cèl·lules T comporta una reducció en la incidència de MECH, no obstant, s'associa a una major taxa de recaigudes degut a la pèrdua de l'efecte anti-neoplàsic de l'ECL, així com a un increment del rebuig de l'empelt i a una major freqüència d'infeccions virals. Per aquest motiu cada vegada es practica menys la depleció T [30, 31].

Alguns grups de recerca han intentat realitzar deplecions parcials de limfòcits T de l'empelt, per tal de trobar un equilibri en el qual els limfòcits T tinguin un efecte beneficiós per al pacient degut al seu ECL, i a l'hora minimitzar les conseqüències negatives de la infusió de les cèl·lules immunocompetents, com pot ser la MECH.

## II.4 EFECTES COL·LATERALS DEL TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS

El TPH s'ha convertit en una teràpia efectiva per a aquells pacients que pateixen una malaltia hematològica congènita o adquirida, pel tractament de desordres autoimmunes i alteracions congènites del metabolisme associades a deficiències enzimàtiques [21, 32], no obstant, el TPH sol anar associat a una elevada incidència de complicacions clíniques. Existeixen certs factors que poden influir en el resultat del TPH (tant autòlegs com al·logènics), alguns d'ells intrínsecs a cada pacient, com per exemple la malaltia de base a tractar o l'edat del receptor; altres són inherents al tipus de trasplantament, com les complicacions derivades de la toxicitat resultant de l'acondicionament, o complicacions derivades de la immunosupressió pre- i post-trasplantament; l'aplàsia induïda torna vulnerables als pacients de patir processos infecciosos degut a l'acusada neutropènia, afavorint l'entrada de patògens de diferents etologies.

En el context dels al·lo-TPH, en el qual intervé el sistema immunitari i se'n deriven fenòmens d'al·loreconeixement entre les cèl·lules del donant i del receptor, ens podem trobar amb

situacions de rebuig. Tot i que és poc freqüent en pacients sotmesos a TPH a partir d'un HLA-idèntic, es pot donar una situació de rebuig de l'empelt quan les cèl·lules immunocompetents de l'hoste reconeixen als PH infosos com a estranys i els ataquen per tal d'eliminar-los (aquest risc incrementa en cas d'incompatibilitat en HLA); l'altra complicació, molt més freqüent, i de conseqüències fatals en molt casos, és la MECH, en la que les cèl·lules immunocompetents de l'empelt reconeixen els antígens propis dels teixits del hoste i reaccionen contra ells per tractar d'eliminar-los.

El present treball es basa en les reaccions al·loreactives que tenen lloc després d'un trasplantament de progenitors hematopoètics al·logènic a partir d'un familiar HLA idèntic, de manera que d'ara endavant, tot el referent a al·lo-TPH farà únicament referència a aquesta modalitat de trasplantament en què donant i receptor són familiars compatibles per a HLA.

### III-MALALTIA D'EMPELT CONTRA L'HOSTE

Un dels detalls rellevants en el desenvolupament del trasplantament de PH va ser l'observació de l'aparició d'una "malaltia secundària" d'un individu a un altre, on els limfòcits T infosos del donant desencadenaven una efecte citotòxic contra els teixits i òrgans vitals de l'hoste (*Billingham & Brent, 1959*), el que coneixem avui dia com a malaltia d'empelt contra l'hoste (MECH) [6].

La MECH és una de les complicacions més sèries que tenen lloc després del trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics i representa la principal causa de mortalitat i morbiditat associades a aquest procediment [33].

Al 1966, *Billingham* va descriure tres requisits que havien de tenir lloc perquè un pacient trasplantat desenvolupés MECH:

- L'empelt ha de contenir cèl·lules immunocompetents
- El receptor ha de presentar un grau d'immunosupressió suficient com per no poder iniciar una resposta immunitària efectiva contra les cèl·lules trasplantades
- Donant i receptor han de presentar diferències antigèniques [33]

Actualment sabem que les cèl·lules immunocompetents són els limfòcits T i que la MECH té lloc quan aquests limfòcits T són transferits d'una persona immunocompetent a una altra incapaç d'eliminar-les.

Clínicament la MECH es classifica en MECH aguda o crònica en funció de les seves manifestacions clíniques i el moment de l'aparició.

Per definició i per motius epidemiològics, es considera MECH aguda (MECHa) a la forma aguda de la malaltia que sol aparèixer abans del tercer mes post-TPH mentre que la MECH crònica (MECHc) és aquella que es manifesta a partir del tercer mes, amb una mitjana d'aparició de 6-9 mesos post-TPH [33].

Tot i que la MECHa és un procés complex, el paper fonamental en el seu desenvolupament s'atribueix a les cèl·lules dendrítiques (CD) del receptor, que actuen com a CPAs mostrant els antígens propis als limfòcits T al·loreactius del donant. La MECH crònica s'iniciaria amb l'expansió dels limfòcits T del donant en resposta als al·loantígens que escapen als mecanismes de supressió a nivell tímic o sang perifèrica [33].

La unió del limfòcits T a través del TCR al complex HLA-pèptid, condueix a l'activació de diverses tirosin-quinases i a l'activació de la calcineurina, i de les vies de coestimulació limfocitària iniciant així el procés clínic que coneixem com a MECH.

### **III.1 MECH AGUDA**

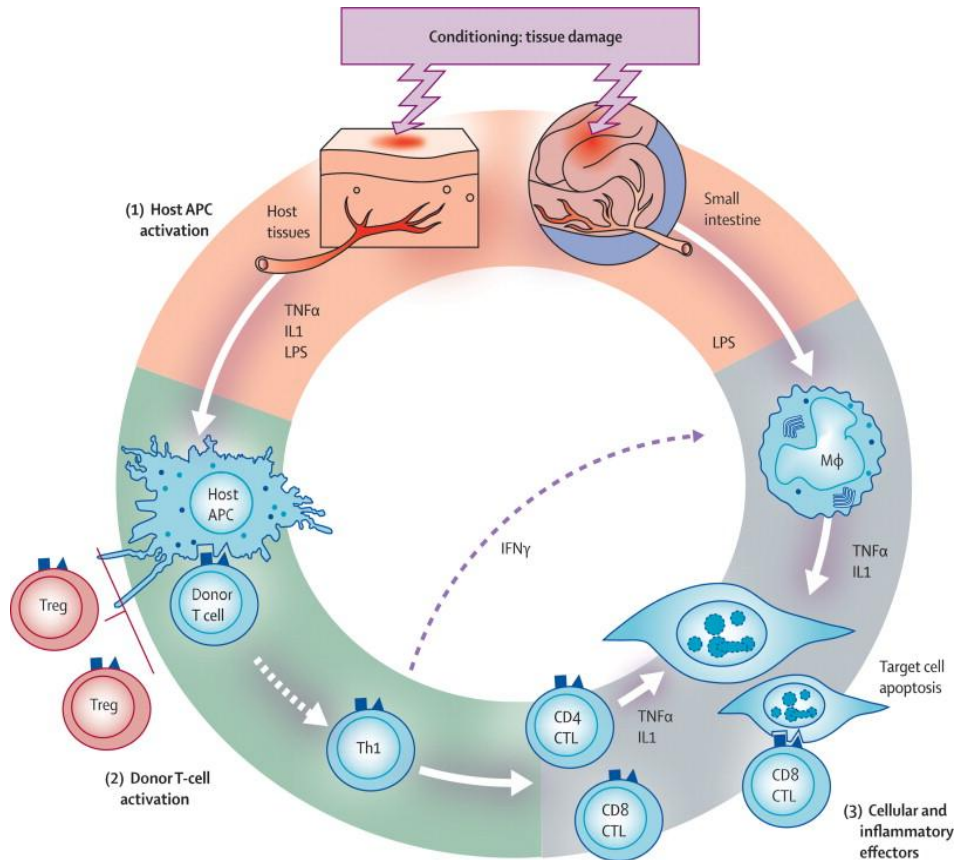
La malaltia d'empelt contra l'hoste aguda afecta del 25-50% dels pacients, segons els protocols de trasplantament, les modificacions terapèutiques, la profilaxis i els factors de risc. En adults que reben un TPH HLA- idèntic, la freqüència promig és del 35%.

S'han descrit diversos factors de risc per a la seva aparició: compatibilitat HLA entre donant i receptor, al·lo-sensibilització del donant, edats del pacient i del donant, relació sexe entre donant i receptor, règim d'acondicionament, quantitat de limfòcits T a l' inòcul, tipus de profilaxis MECH, compliment de la profilaxis, mesures d'aïllament o descontaminació intestinal [17, 34].

#### **III .1.1 Patogènesi de la malaltia d'empelt contra l'hoste aguda (MECHa)**

Les cèl·lules T infoses són les responsables de la inducció de la MECHa, presentant una activitat citolítica davant les cèl·lules del receptor. Les cèl·lules efectores de les reaccions d'empelt contra l'hoste són les cèl·lules T CD4+ i CD8+ i les cèl·lules NK, les quals produeixen dany als òrgans diana per inducció d'apoptosi. La fisiopatologia de la MECHa es fonamenta en la distorsió de la resposta cel·lular a les infeccions per virus i bacteris en els principals òrgans diana, especialment en el tracte intestinal, on s'estimula l'alliberació de citocines i mediadors inflamatoris. La pell, el fetge i el tracte intestinal estan exposats a una gran quantitat d'endotoxines que disparen i amplifiquen la resposta inflamatòria en el pacients de MECHa [34].

El desenvolupament de MEChA pot ser conceptualitzat en 3 fases seqüencials (Figura 5): activació de les CPAs; activació dels limfòcits T del donant i destrucció tissular [35].



**Figura 5:** El desenvolupament de MEChA

El desenvolupament de la MEChA pot ser conceptualitzat en 3 fases seqüencials: 1) Activació de les CPAs; 2) activació dels Limfòcits T del donant; 3) destrucció tissular. Durant la fase 1, són secretades una tempesta de citocines i quimiocines que indueixen l'expressió de molècules HLA i d'adhesió a les CPAs que presenten els antígens propis de l'hoste a les cèl·lules T del donant. A la fase 2, els limfòcits T madurs del donant, interaccionen amb les CPAs del receptor, i inicien la seva activació i proliferació, alliberant d'aquesta manera més citocines. En la fase 3, els òrgans diana són danyats per la migració dels limfòcits T citotòxics i NK cap als teixits. Addicionalment, els monòcits, estimulats pels lipopolisacàrids traslocats a través de la mucosa intestinal danyada, originen la secreció de més citocines inflamatòries, culminant en una evident MEChA [36].



### III.1.1.1 Activació de les CPAs

La quimioteràpia i la radioteràpia pre-trasplantament produeixen dany epitelial i activació cel·lular que indueix a la secreció desmesurada de citocines pro-inflamatòries (TNF (“*tumor necrosis factor*”)- $\alpha$ , IL (interleucina)-1) i factors de creixement (com GM-CSF). Durant aquesta fase s’activen les CPAs que incrementen la seva expressió de molècules HLA en superfície, de proteïnes d’adhesió i de molècules de coestimulació, així com la secreció de citocines; promovent l’activació d’altres CPAs i el reclutament d’altres cèl·lules del sistema immunitari cap a la zona d’actuació.

Aquesta activació pot venir donada també per la presència d’infeccions oportunistes, que aprofiten el dany tissular per traspasar al torrent circulatori.

La importància de l’acondicionament en el desenvolupament de MECHa queda demostrada pel retràs en l’aparició d’aquesta complicació en pacients tractats amb RIC en comparació amb els que reben tractaments mieloablatius convencionals [34, 35]. A més a més, s’ha vist en models pre-clínic, que l’ús d’agents cito-protectors per tal de reduir el dany dels teixits, prevé la MECH [37].

### III.1.1.2 Activació de les cèl·lules T del donant

Les CPAs expressen els antígens als limfòcits T CD4+ i CD8+ del donant, i s’inicia l’activació d’aquests degut a l’al·loreconeixement, quan les molècules HLA de donant i receptor presenten disparitat [34]. Un cop activats, surten dels teixits limfoides i migren cap als òrgans diana per iniciar una resposta immunitària contra els antígens reconeguts com a estranys, amb la secreció de citocines i quimiocines de tipus Th1, entre les quals hi ha IL-2, que juga un paper fonamental en el procés de control de l’amplificació de la resposta immunitària i com a conseqüència, en l’inici de MECHa [38]. Les quimiocines secretades en les zones d’inflamació promouen la migració d’altres limfòcits cap a la zona, la qual cosa resultarà en l’expansió al·logènica.

*Theobald* i col·laboradors van analitzar la freqüència de limfòcits T productors de IL-2 presents en el receptor abans del trasplantament, intentant relacionar un elevat nombre d’aquestes cèl·lules amb una major incidència de MECHa. Els resultats van concordar amb la

hipòtesi, i van proposar els limfòcits T productors de IL-2 com a previsors del desenvolupament de MECHa en el context d'un al·lo-TPH a partir de donants HLA-idèntics [39].

### III.1.1.3 Fase efectora cel·lular i inflammatòria: destrucció tissular

En aquesta fase s'hi troben involucrats efectors cel·lulars amb capacitat citotòxica i citocines (TNF- $\alpha$  i IL-1) produïdes per CPAs estimulades, que provoquen el dany tissular, a més de reclutar més cèl·lules efectoras, que són principalment els limfòcits i NK. Aquests tipus cel·lular utilitzen la via apoptòtica Fas/FasL ("*Fas cell surface death receptor*"/ "*Fas ligand*"), el sistema granzimaB/perforina i receptors TNFR per eliminar les cèl·lules amb antígens irreconeixibles.

Tant TNF- $\alpha$  com IL-1 desenvolupen un paper important en aquesta fase. TNF- $\alpha$  és una molècula efectora en la pell i els teixits limfoides i és crítica en la patofisiologia intestinal. Participa en el desenvolupament de MECH de maneres diferents: activa les CD i promou la presentació d'al·loantígens, recluta limfòcits, neutròfils i monòcits cap a òrgans diana mitjançant inducció de citocines inflammatòries, i causa dany tissular directe per apoptosi i necrosi. IL-1 actua sinèrgicament amb TNF- $\alpha$  [40].

### III.1.2 Gradació clínica de la MECHa

La classificació clínica de la MECHa es realitza en la majoria de centres seguint el criteri de classificació de Glucksberg (1974) amb posteriors modificacions proposades a la "*Conferència consens*" (1995), que identifica 5 graus de severitat (Taula 1) depenent del grau d'afectació dels òrgans diana (fetge, pell i tracte gastrointestinal (TGI)).

Per tal d'homogeneïtzar els criteris i evitar la variació d'estratificació entre centres de trasplantament, s'està treballant en escales objectives de l'estat de la malaltia [41].

**Taula 1:** Gradació clínica de la malaltia d'empelt contra l'hoste (*Glucksberg, 1974*)

Graus	Pell	Fetge	TGI	Alteració funcional
0	0	0	0	0
I	+ / ++	+	0	0
II	+ / +++	+ / ++	++	+
III	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++
IV	++ / ++++	++ / +++ / ++++	++ / +++ / ++++	+++

### III.2 MECH CRÒNICA

Els factors de risc pel desenvolupament de MECH crònica són: haver patit MECH aguda, l'augment de l'edat mitja dels receptors, l'ús de PH procedents de sang perifèrica (60% vs 40% quan els PH són procedents de MO) i existència de disparitats en molècules HLA entre donant i receptor [33].

El paper de l'al·loreactivitat en el context de la MECH crònica constitueix una àrea de debat que es manté sense clarificar. L'al·loreactivitat davant al·lo-antígens explica la MECH crònica com a una manifestació o fase tardana de MECH aguda. No obstant, les manifestacions clíniques de la MECH crònica freqüentment s'assemblen a les descrites en el context de malalties autoimmunitàries, i alguns estudis han identificat els limfòcits T reactius davant d'antígens no polimòrfics comuns (compartits per donant i receptor) que apareixen en el context de dany a nivell tímica i absència de selecció negativa. Per tant, la MECH crònica depèn de la persistència dels limfòcits T que no desenvolupen una resposta immuno-tolerant davant antígens del receptor. Per altra banda, es detecten anticossos anti-nuclears, anti-DNA o anti-múscul llis fins en el 62% dels casos. A més, s'ha trobat una clara relació entre la generació d'anticossos anti-Y o l'expressió del marcador d'activació BAFF (de l'anglès "*B-cell activating factor*"), que promou la supervivència i diferenciació de limfòcits B, i el desenvolupament de la MECHc, el que posa de manifest la rellevància de la resposta immunitària humoral en la seva aparició. Les citocines predominants en la MECHc són les Th2 anti-Y [33].

A més de l'alteració en la funció tímica, s'aprecien alteracions funcionals a nivell perifèric que poden contribuir al desenvolupament de la MECHc. En aquest sentit, tant les CDs del donant

com les del receptor poden contribuir al desenvolupament d'aquesta complicació intervinguda per limfòcits T CD4+ a la pell (en aquest cas contribueixen fonamentalment les CDs del receptor) o en el tracte digestiu (fonamentalment les del donant). Altres mecanismes implicats en la regulació i homeòstasi del sistema immunològic a nivell perifèric, com el limfòcit T regulador, es troben disminuïts en el context de la MECHc [33].

Així doncs, podríem resumir que el procés patofisiològic de la MECH és un procés seqüencial en el que intervenen múltiples factors, des de citocines fins a efectors cel·lulars, mencionant els efectes de l'acondicionament que inicien el dany tissular, incloent els antígens que desencadenen la resposta al·logènica. Variacions en qualsevol d'aquests factors poden traduir-se en potencials afectacions dels processos que donen lloc a l'inici de MECH, de manera que aquesta no arribi a produir-se o n'incrementin la seva severitat.

# IV-IMMUNOBIOLOGIA DE L'AL·LORECONeixEMENT

La presència en una mateixa població de com a mínim dos al·lels per a un locus determinat, cadascuna amb una freqüència superior a 0.01, que no deriva únicament d'una mutació recent, defineix el que coneixem com a polimorfisme. Aquestes variacions genotípiques es poden traduir en canvis fenotípics, o bé poden ser alteracions en la seqüència no codificant del DNA que no obtenen expressió genotípica.

En el context del transplantament de teixits, l'al·loreconeixement ve donat per les diferències polimòrfiques entre donant i receptor, on les cèl·lules T immunocompetents del donant reconeixen els antígens expressats per les molècules HLA a la superfície de les cèl·lules presentadors d'antigen (CPA) del receptor, els identifiquen com a no propis i inicien una resposta immunitària per tractar d'eliminar-los.

## IV.1 PRESENTACIÓ DE L'ANTIGEN

Els limfòcits T són incapaços de reconèixer els antígens, a menys que aquests siguin presentats per cèl·lules especialitzades.

### IV.1.1 Cèl·lules presentadores d'antigen (CPA)

Les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) són cèl·lules especialitzades en captar els antígens (podent ésser d'origen tant extracel·lular com intracel·lular) i processar-los fins a la obtenció de petits pèptids, que són presentats per les molècules codificades pel complex major d'histocompatibilitat als limfòcits T, originant senyals de proliferació i diferenciació limfocitària. Totes les cèl·lules que presentin molècules HLA a la seva superfície són potencialment CPA. No obstant, el terme queda restringit a monòcits, macròfags, limfòcits B, i cèl·lules dendrítiques per la seva alta especialització [42].

Les cèl·lules dendrítiques es troben en la majoria d'òrgans, pell i mucoses, en estat immadur (com les cèl·lules de Langerhans), de manera que presenten poc CMH i molècules de coestimulació en superfície. Després de la captació de l'antigen a nivell perifèric, inicien la maduració mentre migren cap al teixit limfàtic gràcies a l'expressió de nous receptors, amb la finalitat de presentar l'antigen al limfòcit T. Una altra funció de les cèl·lules dendrítiques és reconèixer les propietats del fenomen inflamatori per madurar, segons el cas, amb patrons diferents que podran orientar la resposta T cap a eliminació o tolerància.

Els macròfags juguen un paper molt important en la fagocitosi de microorganismes i paràsits i en el processament dels seus epítops. En la fase efectora de la resposta cel·lular, els limfòcits T reconeixen els Ags en els macròfags i produeixen la seva activació, la qual cosa afavoreix el mecanisme de lisi.

Els limfòcits B utilitzen el receptor de cèl·lules B (BCR) per a unir-se a antígens proteics solubles, internalitzar-los, processar-los i mostrar-los als limfòcits T col·laboradors.

#### **IV.1.2 Molècules HLA**

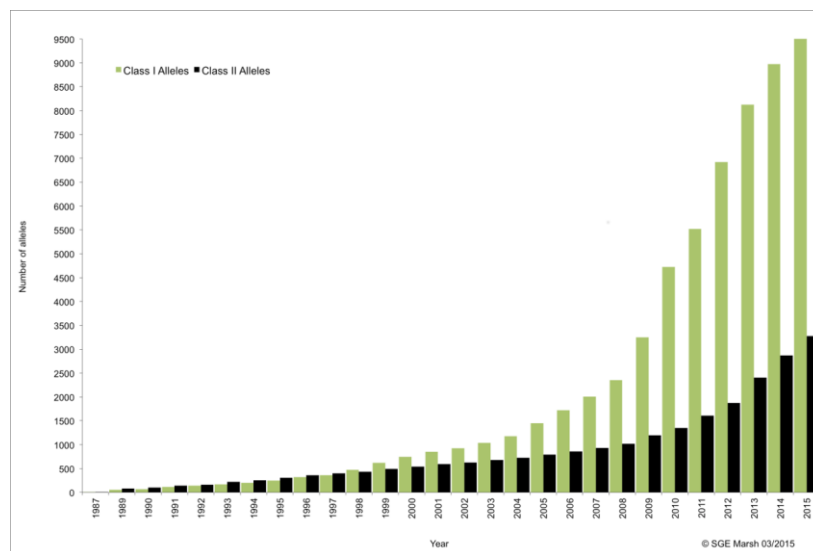
Les molècules HLA van ser descobertes molt abans de que se'n conegués la seva funció normal, i es van descriure com les molècules responsables del rebuig d'empelts trasplantats d'un ratolí a un altre. No obstant, no s'entenia que els individus disposessin de manera fisiològica d'un mecanisme defensor davant la possible invasió de cèl·lules estranyes després d'un trasplantament.

L'estudi estructural d'aquestes molècules i la seva posterior cristal·lització van mostrar la presència d'una fenedura en la seva zona amino-terminal capaç d'ancorar pèptids de mida petita. Es va observar que les respostes immunològiques que tenien lloc després d'un trasplantament entre individus CMH diferents, eren del mateix tipus que les que desencadenaven les molècules CMH pròpies que duïen ancorats pèptids estranys units a elles.

Aquesta observació va servir per determinar la funció de les molècules CMH, que consisteix en protegir un organisme d'infeccions causades per microorganismes, al presentar en la superfície cel·lular fragments peptídics de proteïnes codificades per aquests, de manera que puguin ésser reconeguts pels limfòcits T, es produeixi una resposta immunitària i siguin eliminats.

A més de presentar antígens estranys, les molècules CMH presenten pèptids propis en la superfície cel·lular, que serveixen com a marques d'identitat. En humans, el complex CMH rep el nom de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) ja que van ser identificats per primera vegada en leucòcits i està localitzat en el braç curt del cromosoma 6 (6p21.3). Té una mida d'unes 4000 kb aproximadament, i es caracteritza per ser poligènic i altament polimòrfic [43].

Actualment s'han descrit 53 gens [44] en la regió HLA i més de 13000 seqüències al·lèliques [45] que donen lloc a diferents tipus de molècules HLA (Figura 6). El fet de que existeixin tantes variants al·lèliques en aquests loci gènics fa possible que cada individu presenti una combinació de molècules HLA característica. Cada molècula HLA és capaç d'unir-se a un repertori limitat d'antígens, de manera que els pèptids que es presentin en la superfície cel·lular de cada individu vindran condicionats pel seu genotip. Això es coneix com restricció HLA.



**Figura 6:** Gràfica que mostra el nombre al·lèlic de molècules HLA identificades

En negre HLA de classe II i en verd HLA de classe I, des de 1987 fins al març del 2015 [45].

#### IV.1.2.1 Tipus de molècules HLA

Els gens que componen les molècules HLA s'organitzen en tres regions genòmiques o classes.

Les proteïnes HLA de classe I i II presenten estructures molt similars, essent les dues heterodímers transmembrana, els dominis extracel·lulars amino-terminals formen unes

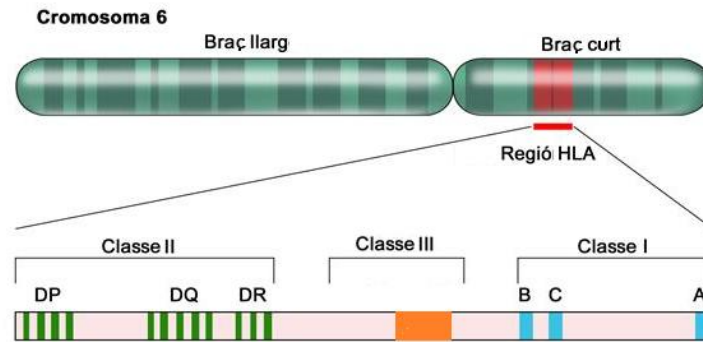
fenedures en les que s'acoblen fragments peptídics per ser presentats a la superfície cel·lular. La regió gènica de classe II, a més, conté gens codificants per proteïnes relacionades amb el processament antigènic. Els gens de classe III, en canvi, no s'encarreguen de la presentació directe de pèptids en superfície, sinó que codifiquen per altres proteïnes, algunes relacionades amb el sistema immunitari i altres que no.

#### IV.1.2.1.1 Molècules HLA de classe I

Les molècules HLA de classe I es troben localitzades a la regió més telomèrica del complex (Figura 7), conté els gens clàssics (Ia): cadenes pesades de HLA-A, -B i -C, aquests gens es caracteritzen per ser elevadament polimòrfics (2743 allels per HLA-A, HLA-B té descrits 3455 al·lels i HLA-C, 2259) [46], la majoria d'aquests són funcionals; i els gens no-clàssics (Ib): HLA-E, -F, -G, HFE (hemocromatosis), MIC (gen "*MHC class I polypeptide-related sequence B*"), menys coneguts i molt menys polimòrfiques.

Amb l'excepció dels gens MIC, totes les molècules de classe I són glicoproteïnes heterodimèriques formades per una cadena  $\alpha$  polimòrfica transmembrana i una cadena invariable de  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-m) (codificada per un gen localitzat al cromosoma 15) unides per enllaços no covalents (Figura 8). Totes les cèl·lules nucleades expressen molècules HLA de classe I a la seva superfície, i carreguen a la seva fenestra pèptids d'uns 8-10 aminoàcids (aa) procedents de la degradació de proteïnes citosòliques, que són reconegudes de manera específica pels limfòcits T CD8+ [46]. La càrrega dels pèptids resultants de la degradació es realitza al reticle endoplasmàtic (RE), amb prèvia traslocació per mitjà de la proteïna TAP (transportador associat al processament d'antigen).





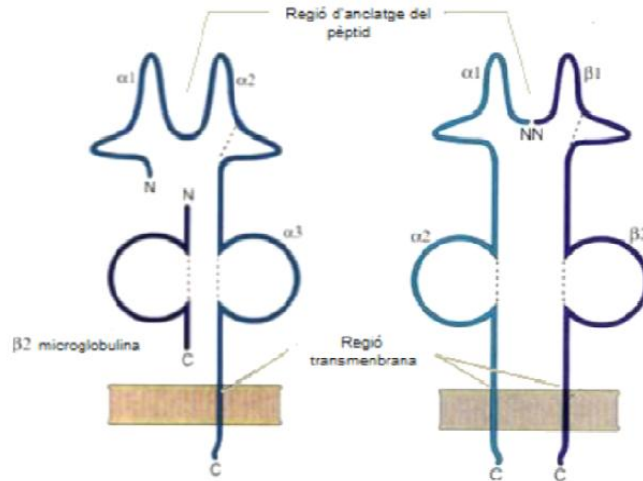
**Figura 7:** Representació esquemàtica del mapa del complex HLA humà

Aquesta regió s'estén 4.106 nucleòtids en el braç curt del cromosoma 6 amb els gens HLA de classe II (es mostren els al·lels DP i DQ), III i I (es mostren els al·lels B,C i A) localitzats en direcció centròmer → telòmer[19].

#### IV.1.2.1.2 Molècules HLA de classe II

Aquests gens codifiquen per les dues cadenes que formen els heterodímers HLA-DR, -DQ, -DP, com a clàssiques, i HLA-DM i -DO, com a no clàssiques; tots ells compostos per dues cadenes una  $\alpha$  i l'altra  $\beta$  (Figura 8). Aquests gens estan localitzats a la regió més centromèrica de la regió CMH (Figura 7). La seva expressió queda restringida a les cèl·lules presentadores d'antigen, tot i que també les podem trobar en altres tipus cel·lular sota condicions anòmales, com per exemple en les cèl·lules epitelials sota procés d'inflamació [47].

Les molècules de classe II interaccionen únicament amb els limfòcits T CD4+. Els antígens peptídics que poden carregar a la fenedura són una mica més grans que els que poden carregar les molècules de classe I, entre 13-18 aminoàcids, podent arribar fins a 25 aa. L'ensamblatge del pèptid es realitza en el lisosoma i/o endosoma ja que la proteïna a partir de la qual es generen sol ser d'origen extracel·lular. Inclosos en la regió gènica de classe II apareixen altres gens implicats en el processament antigènic. S'hi troba LMP, que codifica una sèrie de proteïnes diferents encarregades de la modificació del proteosoma sota determinades condicions, i les subunitats de la proteïna TAP (TAP-1 i TAP-2).



**Figura 8:** Representació esquemàtica de l'estructura molecular de HLA

A l'esquerra de la figura, es representa l'estructura molecular de la molècula HLA de classe I. A la dreta, l'estructura molecular de la molècula HLA de classe II[48].

#### IV.1.2.1.3 Molècules HLA de classe III

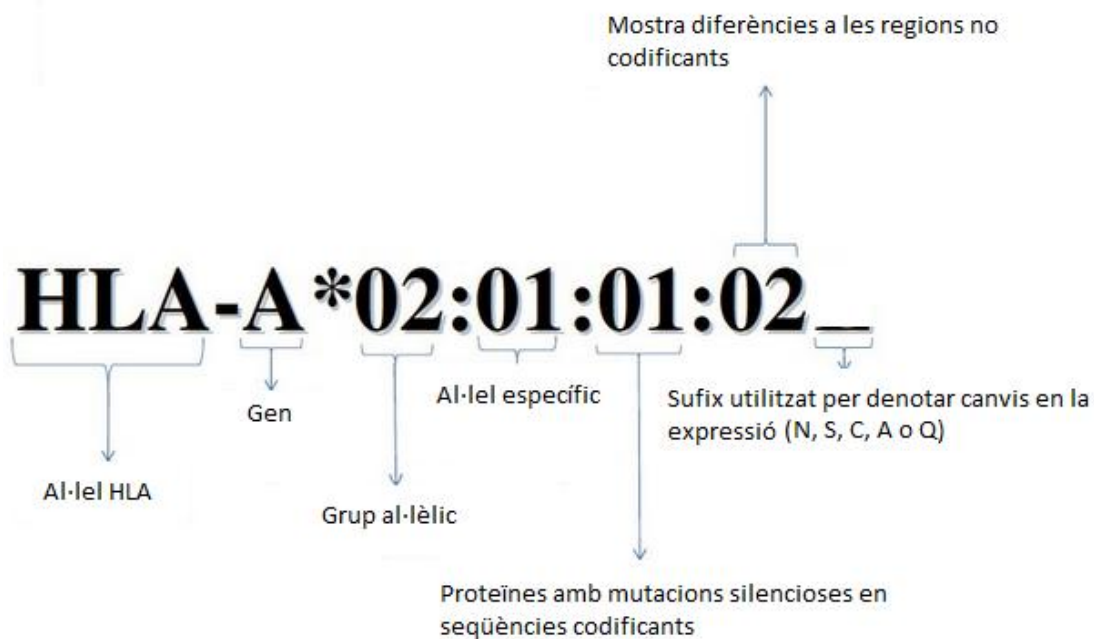
Aquesta tercera regió es troba flanquejada per les altres dues (Figura 7), i conté nombrosos gens, alguns d'ells amb funcions immunològiques importants. Alguns exemples ben coneguts són els gens del sistema del complement (CBF, C2 i C4A), el factor de necrosis tumoral (TNF) o proteïnes implicades en el xoc tèrmic 70 (HSP70) [49, 50].

L'organització genòmica de la regió CMH és punt essencial per entendre com venen regulades l'expressió i la formació de les molècules HLA, en la seva funció de presentar els antigens [46].

#### IV.1.2.2 Nomenclatura de les molècules HLA

Cada al·lel HLA s'identifica amb una sèrie de com a mínim 4 dígits, separats per dos punts. La longitud de la designació de l'al·lel depèn de la seqüència al·lèlica i de la seva posició. Els primers dos dígits descriuen el tipus de molècula. El tercer i el quart número indiquen els subtipus i s'assignen en l'ordre en què s'han determinat les seves seqüències (Figura 9). Podem trobar-nos amb nomenclatures més llargues, que són utilitzades per indicar si el canvi al·lèlic dóna lloc o no a variacions en la proteïna resultant. S'afegeix una tercera sèrie de dígits per

indicar que existeixen diferents al·lels, però que dit polimorfisme es tracta d'una mutació sinònima. I una quarta sèrie s'afegeix per indicar la presència de polimorfismes en regions no codificants. Addicionalment, s'hi poden afegir sufixos per indicar l'estat de l'expressió de l'al·lel. El sufix "N" (de l'anglès "Null") indica que l'al·lel en qüestió no s'expressa. El sufix "S" (de l'anglès "Secreted") és utilitzat per indicar que l'al·lel en qüestió codifica per una proteïna soluble i que no és expressada en superfície cel·lular. Per expressar que l'al·lel en qüestió codifica per una proteïna present al citoplasma s'utilitza el sufix C ("Cytoplasm"). Si hi ha dubte de si la proteïna s'expressa o no, s'utilitza el sufix "A" ("Aberrant"). Finalment, ens podem trobar amb el sufix "Q", de l'anglès "qüestionable", que s'utilitza quan l'expressió d'un al·lel és qüestionable, atès que la mutació pot afectar als nivells d'expressió normals de la proteïna.



**Figura 9:** Representació esquemàtica de la nomenclatura de les molècules HLA

Imatge extreta de <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, i posteriorment modificada [44]

### IV.1.2.3 Herència de les molècules HLA

Els loci HLA són molt polimòrfics probablement degut a una adaptació evolutiva, doncs el paper de les molècules HLA és el de presentar tot tipus de pèptids procedents d'organismes invasors. De fet, molts dels polimorfismes de les molècules HLA es tradueixen en canvis aminoacídics restringits a la zona d'anclatge dels pèptids, suficients per variar-ne la configuració tridimensional de la fenedura. Els polimorfismes de les seqüències al·lèliques de HLA de classe I es localitzen fonamentalment en els exons 2 i 3, i en l'exó 2 els de les seqüències al·lèliques HLA de classe II. Aquesta gran varietat d'estructures és el que possibilita que gairebé qualsevol pèptid antigènic pugui unir-se a les molècules HLA [51].

Estudis familiars han demostrat que la recombinació en aquesta regió és rara, i el conjunt d'al·lels s'hereten, habitualment, com a una unitat denominada haplotip, essent el conjunt dels 2 haplotips (cadascun heretat d'un progenitor) el genotip de l'individu; aquest s'hereta en codominància [51]. Aquest tipus d'herència és deguda a l'elevada concentració de gens HLA en una àrea definida del cromosoma, donant lloc a que s'heretin tots els gens com un paquet. Atès que cada progenitor porta únicament dos haplotips, la probabilitat de tenir en una mateixa descendència dos fills amb un haplotip idèntic, queda reduïda a una de cada quatre.

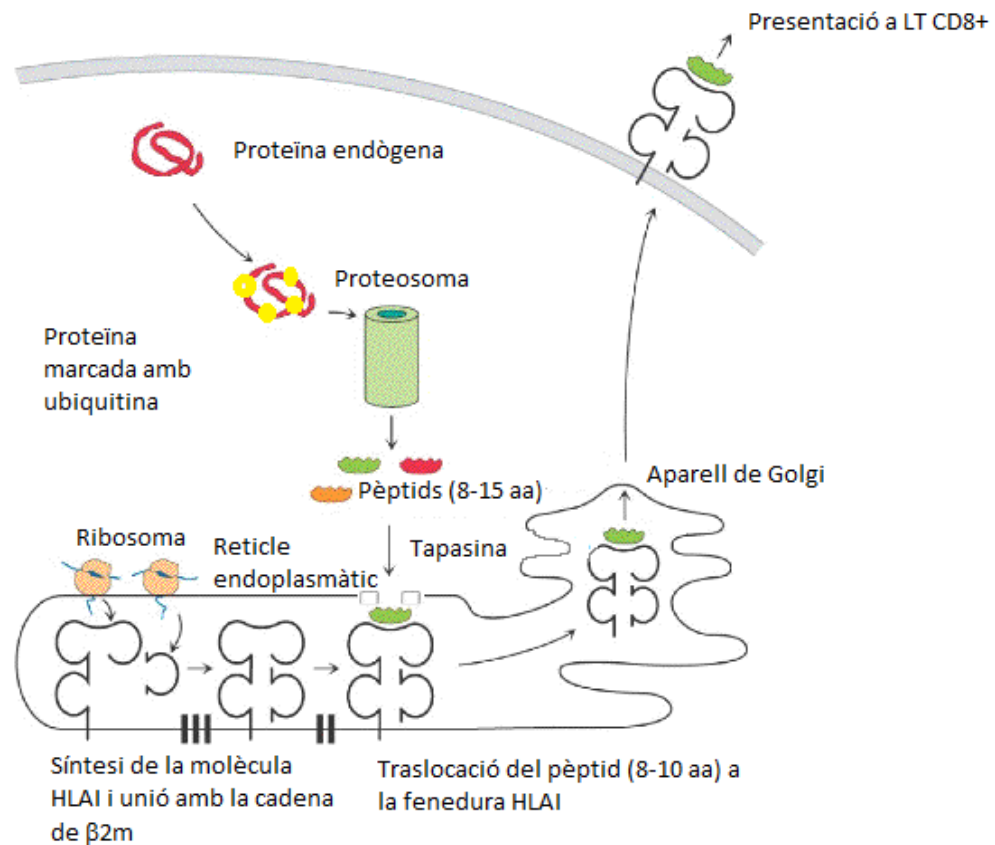
## IV.2 PROCESSAMENT DE L'ANTIGEN

El processament de l'antigen és un procés seqüencial en el que intervenen diversos factors. Té com a objectiu la fragmentació de proteïnes natives en pèptids de mida petita per poder ser carregats sobre les molècules HLA, i posteriorment translocats a la superfície cel·lular. Es distingeixen dues vies de processament antigènic en funció de la procedència de la proteïna a degradar (via endògena i via exògena) i del tipus de molècula HLA sobre la que seran carregats.

### IV.2.1 Via endògena de processament antigènic

Mitjançant la via endògena es presenten els pèptids derivats de les proteïnes sintetitzades per les pròpies CPA. Les proteïnes presents al citosol, són marcades per ubiquitines, que permeten la unió amb els proteosomes, un complex de subunitats de proteases multi-catalítiques. En el cas de la generació del pèptid antigènic, per efecte de l'interferó gamma, algunes de les

subunitats del proteosoma són reemplaçades per tres subunitats homòlogues anomenades LMP2 i LMP7, codificades a la regió classe II del CMH, i MECL1, les quals varien l'especificitat de les peptidases facilitant el trencament dels aminoàcids bàsics i hidrofòbics en l'extrem proper al carboxil, el qual afavoreix la presència de residus capaços d'unir-se a les fenecures de les molècules HLA de classe I. Un cop generats els pèptids, són transportats cap al RE, possiblement degut a la seva unió amb la proteïna HSP70. Al RE s'uniran al complex TAP1-TAP2. Aquest complex transloca els pèptids al lumen de RE, on prèviament hi ha les molècules HLA de classe I ja unides a la  $\beta$ 2-m. Un cop els pèptids ocupen el seu lloc a la fenecura de la molècula HLA de classe I, gràcies a la tapasina, són transportats mitjançant el procés d'exocitosi normal de la cèl·lula (aparell de Golgi) cap a la membrana cel·lular on es manté de manera perllongada per a ser presentats als limfòcits TCD8+ circulants [34] (Figura 10).

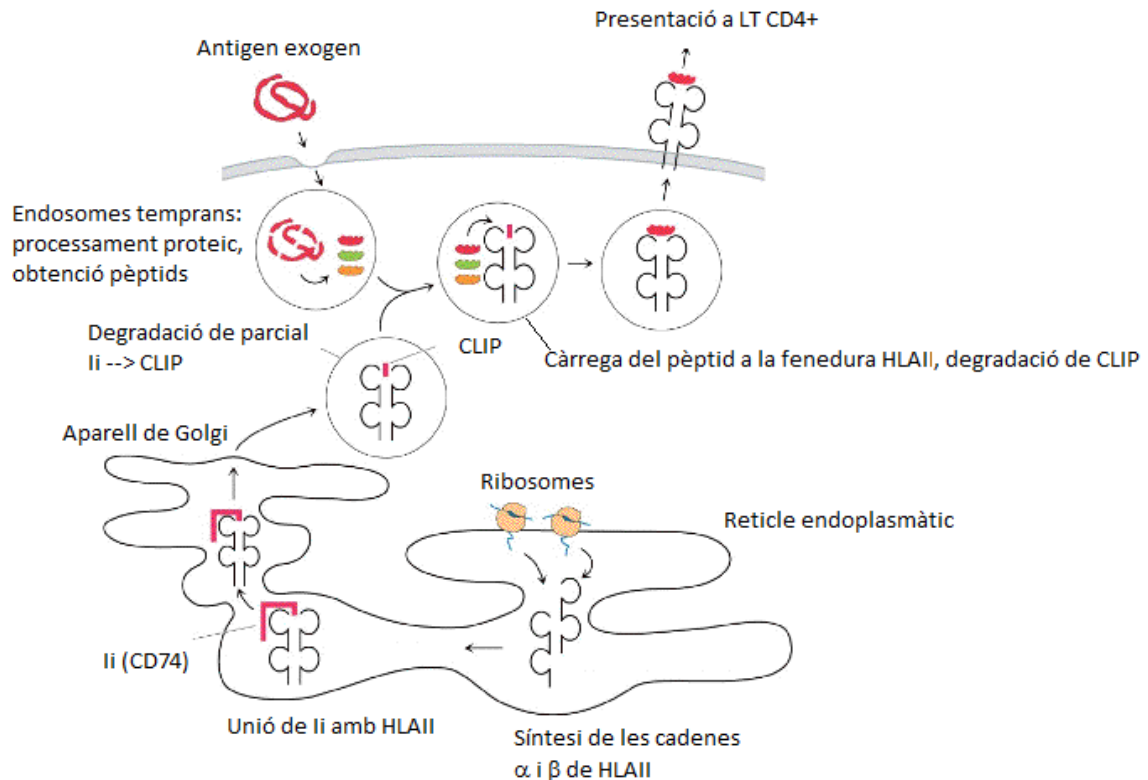


**Figura 10:** Representació esquemàtica de la carrega de pèptids endògens en les molècules HLA classe I. La proteïna endògena és degradada pel proteosoma un cop ubiquitinitzada. Els pèptids resultants, de 8-10aa de longitud, són transportats cap a reticle endoplasmàtic on són carregats a la molècula HLA de classe I, prèviament ensamblada amb la cadena  $\beta$ 2m. Un cop format el complex HLA de classe I-pèptid, són traslladats per l'aparell de Golgi a la superfície cel·lular, on són presentats als limfòcits T citotòxics [52].

### IV.2.1 Via exògena de processament de l'antigen

La via exògena o de classe II permet el processament i presentació d'Ags que entren a les CPA mitjançant pinocitosi o per internalització, després d'haver-se unit a un receptor de membrana (immunoglobulina de membrana dels limfòcits B). Un cop han ingressat per endocitosi, es localitzen als endosomes temprans on seran dirigits a un compartiment endosomas-lisosomes, especialitzat per a la càrrega de pèptids o CPL (de l'anglès "*compartment for peptide loading*"). El CPL té una elevada concentració de proteases i un pH àcid, el què afavoreix la degradació de les proteïnes i la generació de pèptids.

Per altra banda, l'heterodímer de classe II ha estat format a RE per les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$ , i una cadena invariant (Ii) que estabilitza la HLA de classe II i en bloqueja la fenedura perquè cap pèptid present a RE pugui unir-s'hi. El complex  $\alpha$ - $\beta$ -Ii és transportat a través de l'aparell de Golgi cap als CPL, on s'hi troben els pèptids a carregar; la cadena Ii és degradada deixant només el fragment que ocupa la fenedura, el que es coneix amb el nom de CLIP (de l'anglès "*class II-associated invariant chain peptide*"). En les vesícules d'endosomes-lisosomes, el CLIP és remogut en un procés en el qual les molècules HLA-DM participen d'una manera no molt coneguda, i la fenedura és ocupada pels pèptids generats a partir de les molècules antigèniques. Posteriorment, les HLA de classe II carregades amb els pèptids, són transportades dins les vesícules CPL, que es fusionen amb la membrana cel·lular permetent-ne la seva expressió superficial per a ser reconegudes pels limfòcits TCD4+ (Figura 11).



**Figura 11:** Representació esquemàtica de la càrrega de pèptids exògens en les molècules HLA de classe II. La proteïna d'origen exogen és endocitada i roman als endosomes on és degradada en pèptids. Per altra banda, la proteïna HLA DE CLASSE II és ensamblada, i la seva fenedura queda ocupada per Ii, que és degradat parcialment fins a l'obtenció del pèptid CLIP. El complex HLA DE CLASSE II-CLIP i els pèptids es troben a les vesícules endosoma-lisosomal, on la molècula CLIP és degradada i el seu lloc l'ocupen els pèptids exògens. Un cop format el complex HLA DE CLASSE II-pèptid, és transportat a la superfície cel·lular on seran exposats als limfòcit TCD4+[52].

### IV.3 RECONeixEMENT ANTIGÈNIC-ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA

L'esdeveniment central en les respostes immunitàries, incloent la resposta als al·loantígens, és el reconeixement dels antígens per part dels RCT dels limfòcits T, presents en les molècules HLA de les cèl·lules presentadores d'antigen. Els limfòcits T madurs circulants en sang perifèrica, no es dirigeixen d'una forma directa a la cèl·lula diana que porta el fragment antigènic que és capaç de reconèixer, sinó que s'aproxima a les cèl·lules del seu entorn inspeccionant el contingut de les seves molècules d'histocompatibilitat. Quan detecten un pèptid antigènic s'inicia el que s'anomena sinapsis immunològica.

### IV.3.1 Sinapsis immunològica – Activació dels limfòcits T

El procés de reconeixement immunitari s'inicia a partir de la interacció tri-molecular: HLA-pèptid-RCT. Aquesta interacció té una constant de dissociació elevada, pel què és necessària la participació d'altres molècules i la formació de la sinapsi immunològica (SI) per garantir que aquesta interacció tingui lloc el temps suficient per què es doni l'activació limfocitària.

Durant la dècada dels 70 es va començar a mostrar un gran interès per la sinapsi citotòxica pel seu clar paper en la immunologia. És un dels primers i més ben estudiats tipus de sinapsi i el seu coneixement va donar a lloc a la descripció d'altres subconjunts de cèl·lules T. *Zinkernagel i Doherty* [53, 54] van definir el paper del CMH en l'eliminació de cèl·lules infectades per virus per part de limfòcits T sensibilitzats, que actualment, reben el nom de limfòcits T citotòxics (LTC). La descripció de molècules d'adhesió com per exemple LFA-1 (de l'anglès "*leukocyte function-associated antigen-1*") [55], la polarització dels limfòcits T citotòxics [56, 57], i la secreció directe de perforines (responsables de permeabilitzar la membrana de les CPAs) i granzimes (estimulen l'apoptosi cel·lular) per a l'elevació de concentracions de  $Ca^{2+}$  a citoplasma [58], va portar a la proposta d'una base sinàptica per les cèl·lules T. La clonació dels RCT i la definició de pèptids ancorats a les fenèdres de les molècules HLA i dels lligands dels RCT, van permetre la generació de cèl·lules T monoclonals de ratolí, amb el que es va poder aprofundir en la sinapsi immunològica [54].

Com s'ha comentat prèviament, existeixen dos isotips de molècules del RCT formades per heterodímers de cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  (Tab), o en rars casos, de cadenes  $\gamma$  i  $\delta$  (Tgd) unides per enllaços disulfur. Cadascuna d'elles està conformada per dos dominis extracel·lulars, una regió transmembrana i una regió intracitoplasmàtica. Els RCT no són mai secretats, els trobem sempre associats a la membrana cel·lular, a diferència de les immunoglobulines, tot i la seva analogia estructural. En els dominis extracel·lulars hi trobem una elevada variabilitat aminoacídica formant les anomenades regions determinants de la complementarietat que són les responsables del reconeixement dels pèptids presentats per HLA [34].

Aquests heterodímers s'associen de manera no covalent a un complex format per 3 proteïnes transmembrana de baix pes molecular i no polimòrfiques ( $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\xi$ ) conegudes com a complex CD3. El CD3 col·labora en la SI transduint la senyal a l'interior de la cèl·lula.



La importància del CD3 en l'activació limfocitària en la resposta al·logènica està més que demostrada per l'ús de d'anticossos monoclonals anti-CD3 per a la prevenció i el rescat dels rebuigs aguts en transplantaments d'òrgans sòlids [34].

Un cop s'uneixen RCT-pèptid-HLA, hi ha un "reclutament" dels coreceptors CD4 o CD8, el que resulta en la fosforil·lació de les regions citoplasmàtiques de CD3, les quals contenen residus de tirosina localitzats en els anomenats ITAM (de l'anglès "*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*") per l'acció de les tirosin-quinases. Els ITAM fosforil·lats poden activar altres quinases, com ZAP-70 (de l'anglès "*zeta chain associated protein-70*"), que s'uneixen als ITAM fosforil·lats. Un cop activades les proteïnes ZAP-70 es propaguen diverses vies d'activació que, eventualment, arriben al nucli. Una d'aquestes vies dona lloc a la generació d'inositol trifosfat ( $IP_3$ ) que augmenta les concentracions de  $Ca^{++}$  lliure en el citoplasma portant a l'activació de la fosfatasa-calcineurina, la qual defosforil·la el factor de transcripció NFAT (de l'anglès "*nuclear factor of activated T cells*"), permetent-ne la seva entrada a nucli. L'activació de la calcineurina, és precisament la diana dels immunosupressors més potents utilitzats actualment en trasplantaments com per exemple la ciclosporina [34].

En ocasions la interacció HLA-pèptid-RCT és de tal intensitat que no calen la presència de molècules de coestimulació en la SI per tal del que el limfòcit s'activi i arribi a diferenciar-se [59, 60]. No obstant, la no presència de molècules de coestimulació provoca que els limfòcits no responguin de manera adequada, no es produeixin citocines, no es divideixin, i entrin en un estat de no resposta, conegut com anèrgia [61, 62]. El terme d'anèrgia va ser utilitzat per descriure un fenomen que tenia lloc en els limfòcits quan interaccionaven amb un Ag en absència de CPA professionals i quedaven en un estat d'hipo-resposta, que afectava a la producció de IL-2 i a la proliferació limfocitària [63]. El descobriment de que l'anèrgia tenia un efecte directe sobre els nivells de producció d'IL-2, va portar a la recerca de senyals de coestimulació que intervinguessin en la via d'aquesta citocina. D'aquesta manera es va identificar CD28.

#### **IV.3.1.1 Molècula coestimuladora CD28**

La molècula CD28 es troba present en la superfície de gairebé la totalitat dels limfòcits T CD4+, i en aproximadament la meitat de la població dels limfòcits T CD8+. CD28, al unir-se als seus receptors CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2), coneguts com a família B7, inicia una cascada de

transducció de senyals que actua de manera sinèrgica amb la produïda pels RCT i que porten al limfòcit a un nivell d'activació complet.

Actualment es sap que la via CD28 regula el llindar a partir del qual es dona l'activació del limfòcit T i redueix de manera significativa el nombre d'interaccions de RCT requerides per a la correcta activació de les cèl·lules T.

Es van realitzar experiments *in vivo* i *in vitro* que van demostrar que després d'una estimulació amb CPAs fixades químicament, els limfòcits T eren capaços d'activar-se, únicament, si s'afegien al cultiu anticossos anti-CD28 intactes. En canvi, quan s'incubaven amb fragments d'unió a l'Ag (regions Fab) d'anti-CD28, els clons dels limfòcits T esdevenien hipo-reactius [64]. Altres models experimentals que cal remarcar són aquells que treballen amb ratolins *knock-out* CD28 doble negatiu (CD28<sup>-/-</sup>). Aquests ratolins generaven una resposta deteriorada davant les lectines. L'estimulació amb lectines no estimulava la producció de IL-2 i el receptor de IL-2 $\alpha$  es veia significativament disminuït. A més les concentracions d'immunoglobulines basals es veien reduïdes en 1/50 en ratolins CD28<sup>-/-</sup> al comparar-los amb ratolins *wild-type*. No obstant, tot i que els limfòcits T citotòxics es veien reduïts, es va observar la capacitat de reaccionar contra algunes infeccions víriques, i aquestes reaccions es caracteritzaven per ser el suficientment intenses i persistents com per generar una resposta immunitària en absència de coestimulació. Aquests resultats suggerien que CD28 no és exclusiu per respostes de les cèl·lules T *in vivo*, i que haurien d'existir altres vies de coestimulació [65].

Més tard es va revelar com la interacció de CD28 amb B7 tenia com a resultat l'increment d'estabilitat del RNA missatger i de la producció de IL-2 (factor de creixement dels limfòcits T) [66, 67]. En alguns models experimentals s'ha observat que el bloqueig de la via CD28/B7 no es tradueix en una disminució de l'expansió cel·lular T, sinó que es produeix un desequilibri del balanç Th1-Th2 [68].

Th1 i Th2 són dos subtipus de cèl·lules T, que difereixen entre ells per la seva capacitat de produir citocines. Les cèl·lules Th1 són capaces de produir citocines pro-inflamatòries rellevants en les respostes contra malalties infeccioses, processos autoimmunitaris i teixits trasplantats. Les Th2, per altra banda, són capaces de produir diferents interleucines (-4, -5, -10), necessàries pel desenvolupament de les respostes humorals i pel control de la diferenciació de les cèl·lules Th1. Ambdues poblacions participen en el control de les mateixes reaccions autoimmunitàries teixit-específiques.

La coestimulació mediada per la via B7/CD28, promou la diferenciació de les cèl·lules T naïve cap a un fenotip Th2, a més de promoure la supervivència cel·lular i incrementar l'expressió de proteïnes anti-apoptòtiques [68-70]. També, sembla que aquesta via, estaria implicada en processos de migració cel·lular [71], i que podria tenir un control en l'homeòstasi de les cèl·lules T reguladores, essencials pel manteniment de la tolerància als teixits propis.

A més de CD28, existeixen altres molècules que participen en aquest procés de coestimulació.

#### IV.3.1.2 Altres molècules de coestimulació

S'han descrit varies molècules homòlogues de CD28 i de B7 que també estan involucrades en l'activació i diferenciació de les cèl·lules T.

##### IV.3.1.2.1 ICOS

ICOS (de l'anglès "*inducible co-stimulator*") és una proteïna homòloga de CD28. Aquesta és induïda a superfície cel·lular un cop s'ha iniciat l'activació de les cèl·lules T [72, 73]. Varies estudis posen de manifest que la senyal de coestimulació d'ICOS incrementa l'activació i la diferenciació dels limfòcits T, així com que promou les respostes efectores. La intervenció de ICOS estimula, bàsicament, la producció de citocines efectores IL-4 i IL-10, i en menys quantitat IL-2, interferó- $\gamma$ , i TNF- $\gamma$ . D'aquesta manera juga un paper important en les respostes mediades pels limfòcits T Th2. L'expressió aberrant d'aquesta immunoglobulina es relaciona amb diverses malalties autoimmunitàries, com lupus sistèmic eritematós, o artritis reumatoide [73].

El seu lligand, homòleg a B7, rep el nom de LICOS (també conegut com a B7h, B7RP-1, GL-50 o B7H2). Un cop units LICOS-ICOS (Figura 13), s'inicia una cascada de senyals amb l'objectiu d'interaccionar sinèrgicament amb la senyal d'activació i proliferació iniciada pel complex B7-CD28 [74]. Tot i l'homologia entre molècules, s'ha vist que no existeixen interaccions creuades, és a dir, ICOS no formarà complex amb les molècules B7 (-1, -2) i CD28 no s'unirà a LICOS [74]. En un model de trasplantament cardíac en ratolins, *Nanji* i col·laboradors van veure que eliminant l'estimulació del complex ICOS-LICOS utilitzant anticossos monoclonals (anti-ICOSmAB), o bé treballant amb ratolins ICOS<sup>-/-</sup>, s'incrementava l'acceptació de l'empelt [75].

#### IV.3.1.2.2 Molècules coestimuladores de la superfamília TNF (de l'anglès " Tumor Necrosis Factor")

##### CD40

El gen CD40 codifica per una proteïna que es troba expressada en les APCs (limfòcits B, CD, macròfags i cèl·lules endotel·lials) [76]. La coestimulació a través de CD40 és necessària per a la producció d'immunoglobulines G (IgG), centres germinals i cèl·lules B memòria [77]. També s'expressa en el 30-70% de tumors sòlids, inclòs el melanoma. El lligand natural de CD40 és CD40L (també conegut com a CD154) i s'expressa a la superfície del limfòcit T activat [78] (Figura 13).

Així mateix, s'ha vist en models de ratolins que el fenotip CD40<sup>-/-</sup> es tradueix en una deficiència de l'isotip de cèl·lules B, així com ratolins deficients en CD40L tenen disminuïda l'activació limfocitària T [79]. Varis estudis posen de manifest la importància de les interaccions de coestimulació per part de CD28-CD80/86 i CD40-CD40L en la generació dels correctes subtipus de cèl·lules T, incloent les cèl·lules T *Natural Killer* (NK) i els limfòcits T reguladors, i en la generació de tolerància pels antígens propis de les cèl·lules T madures [80].

##### OX40

Aquest gen, conegut també com a CD134 codifica per un receptor ancorat a la membrana dels limfòcits T. Estudis en ratolins *knock out* suggereixen que aquest gen promou l'expressió de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (com BCL2), i que podria desenvolupar un paper important en les respostes immunitàries mediatees pels limfòcit T CD4<sup>+</sup>, així com també en la proliferació i diferenciació de les cèl·lules T dependents de les cèl·lules B [81] .

El seu lligand, OX40L es troba a la superfície cel·lular de les APCs. S'ha vist que ratolins OX40L<sup>-/-</sup> són deficients en la generació de cèl·lules memòria, en la presentació antigènica i en la producció d'anticossos [79] . De fet, hi ha estudis que demostren que el bloqueig del complex OX40-OX40L en un context de transplantament al·logènic en ratolins, a partir de progenitors hematopoètics provinents de moll d'os, disminueix la mortalitat relacionada amb la malaltia d'empelt contra l'hoste [82].

#### 4-1BB

La proteïna codificada per aquest gen pertany també a la superfamília de TNF, i contribueix a l'expansió clonal, supervivència i desenvolupament de cèl·lules T. Pot induir la proliferació de monòcits a sang perifèrica i incrementar l'apoptosi cel·lular induïda pel complex RTC-CD3. L'expressió d'aquesta proteïna és induïda per l'activació limfocitària [83].

### **IV.3.2 Sinapsis immunològica – Inhibició dels limfòcits T**

La resposta immunitària és autoregulada, o s'autolimita. L'autoregulació és una propietat important en quant a que s'assegura que les respostes persisteixin només mentre siguin necessàries.

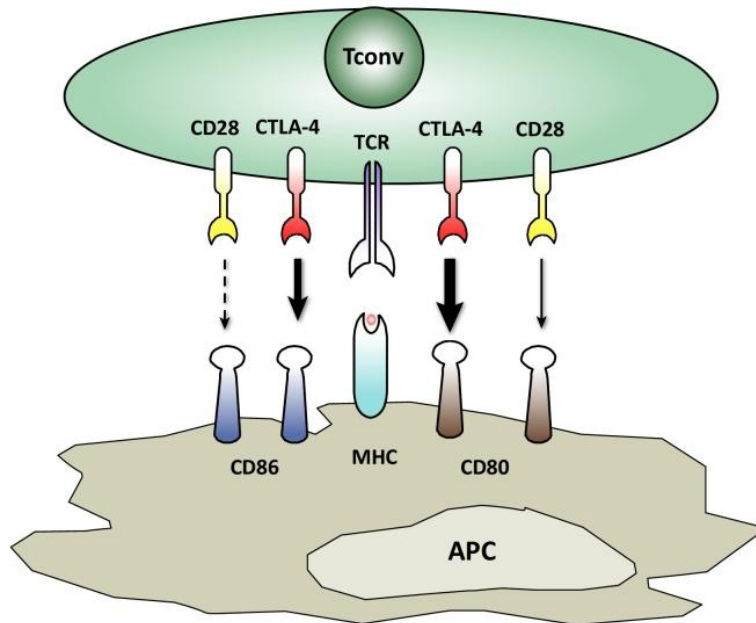
La inhibició de la resposta immunitària ve donada per la presència de molècules que participen en la SI.

#### **IV.3.2.1 Molècula inhibidora CTLA-4**

La molècula CTLA-4 (de l'anglès "*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*") es va descriure durant la recerca de productes gènics importants per a la funció dels limfòcit T citotòxics.

Ràpidament es va veure que CTLA-4 compartia moltes similituds amb CD28, entre elles el domini MYPPPY en la regió extracel·lular [84] que permet, tant a CD28 com a CTLA-4 unir-se amb el seu lligand B7 (Figura 12)[85]. *Linsley* i col·laboradors van demostrar que la capacitat de CTLA-4 per unir-se als lligands B7 (B7-1 i -2) era major que la que presentava CD28. L'afinitat amb què CTLA-4 s'unia a B7 era de 500 a 2000 vegades major (depenent de la tècnica amb què es treballés) que la que s'havia observat amb CD28 (Figura 12). A més, CD28 i CTLA-4 presenten patrons d'expressió molt dispars: CD28 s'expressa de manera constitutiva en els limfòcits T naïve, mentre que CTLA-4 no és detectable en el limfòcit T en repòs, tot i que després d'una activació limfocitària s'observa un increment notable dels nivells de RNA missatger de CTLA-4 [86]. Per tant, CTLA-4 competeix amb CD28 per unir-se als seus lligands comuns, antagonitzant les senyals de coestimulació. La competència entre CTLA-4 i CD28 és fonamental en la decisió del tipus de resposta del limfòcit T. Ha estat demostrat que el balanç entre aquestes dues molècules antagòniques unides a B7, determina si el limfòcit T tindrà una

resposta reactiva (quan predomina la unió CD28-B7) o s'anergitzarà (quan predomina la unió CTLA-4-B7). Si la CPA expressa un nombre elevat de lligands CD80 i CD86, CTLA-4 es saturarà i predominarà la unió de CD28, amb la conseqüent activació. Si pel contrari la CPA expressa pocs lligands, predominarà la unió de CTLA-4 (per la seva major afinitat) i el limfòcit T s'anergitzarà [87].



**Figura 12:** Representació esquemàtica de les afinitats de CD28 i CTLA-4 pels seus lligands

Els receptors CD28 i CTLA-4 de les cèl·lules T són capaços d'unir-se als receptors B7 (CD80 i CD86) presents a la superfície de les CPAs. Aquestes interaccions presenten diferents afinitats (representades per la grossor de les fletxes), mostrant que CTLA-4 presenta més afinitat pels dos lligands que CD28. Tconv: limfòcit T convencionals, APC: cèl·lules presentadores d'antígens (de l'anglès "*antigen-presenting cells*"), MHC: molècules complex major d'histocompatibilitat (de l'anglès "*Major histocompatibility complex*") [88].

Hi ha estudis que posen de manifest la clara funció inhibidora de CTLA-4, el bloqueig d'aquesta amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28, en cèl·lules que han estat estimulades prèviament, incrementa la proliferació cel·lular i la producció de IL-2, mentre que l'estimulació simultània de RCT i CTLA-4 no resulta en l'activació del limfòcit T [89].

L'evidència definitiva del paper inhibitori de CTLA-4, sorgeix de l'observació de ratolins amb fenotip CTLA-4  $-/-$ , que al cap de 5-6 dies del naixement, desenvolupaven un desordre limfoproliferatiu que acabava amb la mort degut a la infiltració limfocitària a teixits no

limfoides [90]. Les cèl·lules T d'aquests ratolins *knock out* per CTLA-4 presenten un fenotip característic de cèl·lules activades, de manera generalitzada, sense estar restringit a un subtipus cel·lular concret, tot i que sembla ser que les cèl·lules T *Helper* s'activen preferentment a l'inici del procés limfoproliferatiu. A més, s'ha vist que cèl·lules T CTLA-4 *-/-*, es mantenen activades de manera continuada, però són sensibles a l'apoptosi mediada per Fas [91]; aquestes observacions permeten concloure que CTLA-4, actua limitant l'expansió cel·lular i no promovent la mort per apoptosi.

No obstant, el mecanisme d'acció de CTLA-4 encara no està clar. Existeixen indicis de que CTLA-4, a part d'enviar senyals inhibidores directament a la cèl·lula que l'expressa, indueix l'alliberació de senyals de factors addicionals, doncs s'ha vist que, aquests ratolins CTLA-4 *-/-* en presència de cèl·lules CTLA-4 *+/+* són capaços d'activar-se, expandir-se i finalitzar una resposta de manera normal [92]. No obstant, ratolins modificats genèticament per a què expressin CTLA-4 carents de cues citoplasmàtiques, presenten un fenotip limfoproliferatiu, de menor intensitat que ratolins CTLA-4 *-/-*, però no despreciable [93].

*Walker* i *Sansom*, proposen un model en el qual la funció inhibidora de CTLA-4 ve mediada per la regió extracel·lular; no obstant, el domini citoplasmàtic contribueix en aquesta funció inhibidora controlant la quantitat, la localització cel·lular, i el "*timing*" d'expressió de CTLA-4 a la membrana. D'acord amb aquest model, el paper de la regió citoplasmàtica no és la de transmetre senyals d'inhibició a l'interior de la cèl·lula, sinó de dirigir el trànsit de la pròpia molècula CTLA-4. Per tant, les cues citoplasmàtiques vindrien a ser la clau de l'eficiència de la funció d'aquesta proteïna [88].

Des de la seva identificació, CTLA-4 ha estat objecte d'estudi de múltiples treballs, els quals han posat de manifest la gran diversitat de mecanismes dels que disposa el limfòcit T per mantenir l'homeòstasi cel·lular i la importància del paper de CTLA-4 en el control de la tolerància immunològica. CTLA-4 està essent abordat des del punt de vista immunoterapèutic. Per exemple, s'ha vist en sistemes experimentals que tractaments que bloquegen CTLA-4 provoquen regressió dels tumors, demostrant que l'eliminació de senyals inhibidores en la coestimulació limfocitària estimula la immunitat antitumoral [94].

#### IV.2.2 Molècula inhibidora PD-1

Una altra molècula homòloga de CD28, amb funció inhibidora de la resposta immunitària és PD-1 (de l'anglès "*Programmed death-1*"), que a diferència de CTLA-4 és àmpliament expressada en diferents subpoblacions cel·lulars, com limfòcits T activats, LB, NK i cèl·lules de línia mieloide. Els seus lligands són les molècules PD-L1 i PD-L2, pertanyents a la família de B7 (Figura 13). La interacció PD-1 - PD-L2 és de 2 a 6 vegades més afí que la de PD-1 – PD-L1 [95].

S'ha vist que els ratolins *Knock out* per PD-1, desenvolupen processos autoimmunitaris com lupus [95].

La formació del complex PD-1-PD-LX inhibeix la proliferació limfocitària i la producció de citocines implicades en el procés d'expansió. El mecanisme pel qual actua no està del tot clar, no obstant, és conegut que indueix preferentment la producció de IL-10 i en alguns casos l'apoptosi.

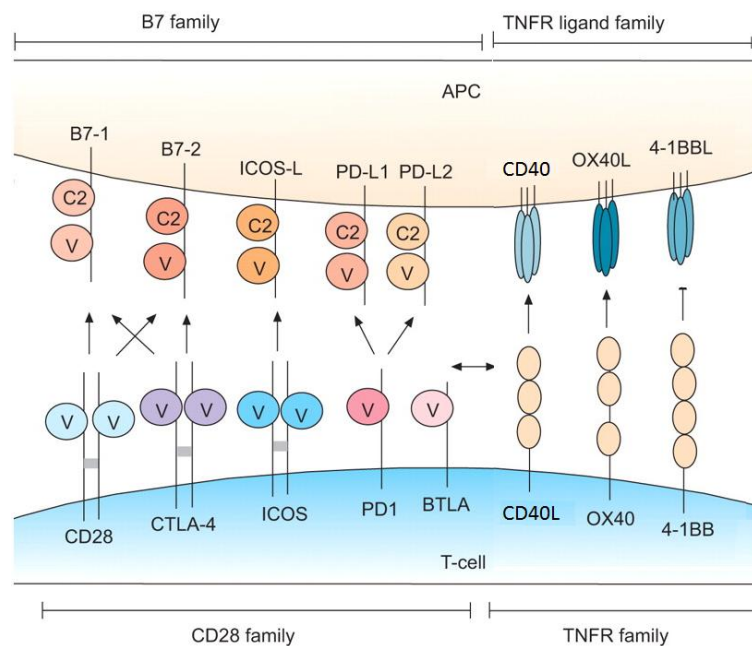
S'ha observat l'expressió d'ambdós lligands de PD-1 en diferents línies i teixits tumorals, el què suggereix que aquesta via té un paper important com a mecanisme d'evasió immunitària, suprimint la resposta dels limfòcits T efectors. També s'ha vist un increment d'aquests lligands en pacients de VIH o coriomeningitis limfocítica, la qual cosa s'associa a un increment de IL-10 i un conseqüent progrés de la infecció [95].

S'ha vist que les cèl·lules tumorals utilitzen mecanismes immuno-reguladors per "amagar-se" del sistema immunitari. Avenços en el coneixement del melanoma i la seva interacció amb el sistema immunitari han portat al desenvolupament d'anticossos antagònics a PD-1 i a un dels seus lligands ( PD-L1), i s'estan obtenint grans beneficis clínics mitjançant el bloqueig d'aquest lligand en cèl·lules canceroses. La combinació d'anti- PD-1 en combinació amb altres teràpies antitumorals, ja estan essent provades i donant el seu fruit, allargant la supervivència de pacients de melanoma, càncer de pulmó de cèl·lules no petites, carcinoma de cèl·lules renals, càncers de cap i coll i limfoma [96] .



### IV.3.2.1 Altres molècules d'inhibició limfocitària

Existeixen altres vies que tenen un paper important en la inhibició limfocitària, no obstant no són tant conegudes com les descrites anteriorment. És el cas del gen BTLA (de l'anglès "*B and T lymphocyte associated*"), que codifica per una proteïna membre de la superfamília de les immunoglobulines. La proteïna resultant conté un únic domini d'immunoglobulina i és un receptor que transmet senyals inhibidores per suprimir la resposta immunitària. Existeixen múltiples trànscripats degut a l'"*splicing*" alternatiu, i una àmplia varietat de polimorfismes, alguns d'ells associats a un major risc de patir artritis reumatoide [97].



**Figura 13:** Representació esquemàtica de les molècules coestimuladores i els seus receptors

A la cèl·lula T del donant es representen tots els membres descrits prèviament de la família de CD28 (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 i BTLA) i molècules de la família de TNFR: de l'anglès "*tumor necrosis factor receptor*". A la cèl·lula presentadora d'antigen (APC: de l'anglès "*antigen-presenting cell*"), es representen tots els membres de la família de B7 descrits anteriorment, i els lligands corresponents a la família de TNFR. El sufix L: de l'anglès "*ligand*" [98].

Existeixen polimorfismes en els gens que codifiquen per aquestes molècules d'estimulació o inhibició limfocitària que poden donar lloc a una major o menor capacitat d'expressió del gen. En el context d'un trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics a partir d'un donant HLA idèntic, caldria esperar que aquells polimorfismes que modifiquin la funcionalitat d'aquests gens cap a una major tolerància immunològica s'associessin a un menor incidència de malaltia d'empelt contra l'hoste.

# V-POLIMORFISMES GENÈTICS IMPLICATS EN L'APARICIÓ DE LA MALALTIA D'EMPELT CONTRA L'HOSTE

En el context d'un trasplantament al·logènic, el donant ideal és aquell que comparteixi identitat genètica pel què fa a les molècules HLA, d'aquesta manera, es redueix el risc d'aparició de complicacions al·loimmunogèniques, ja que aquestes, com s'ha vingut descrivint al llarg de la introducció, són una de les principals causes d'aparició de la malaltia d'empelt contra l'hoste [99]. El nombre de disparitats HLA entre donant i receptor està directament relacionat amb l'aparició d'aquesta complicació [100, 101].

Un dels factors més importants que ha contribuït a la millora dels resultats de trasplantament de progenitors hematopoètics ha estat el progrés de tècniques moleculars per al tipatge d'alta resolució de les molècules HLA. A l'hora de fer un trasplantament, es tenen en conte sis loci polimòrfics "clàssics": HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1. Durant anys, el trasplantament ideal era considerat quan hi havia una coincidència de 10/10 al·lells entre donant i receptor (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1). Recentment, basat en els resultats de diversos estudis, una coincidència de 8/8 al·lells (HLA-A, -B, -C, -DRB1) genotipats a alta resolució és suficient per realitzar un TPH a partir d'un donant no emparentat [102]. No obstant, s'han descrit algunes disparitats en els loci HLA-DP i -DQ que s'associen a un mal pronòstic post-trasplantament [103].

En determinades circumstàncies, la presència d'una disparitat antigènica en les molècules HLA és acceptable, en els loci HLA-A, -B o -DR, tot i que es prenen mesures profilàctiques majors, doncs el risc del desenvolupament de MECHa incrementa considerablement [100]. El desenvolupament de noves profilaxis per MECH, permeten avui dia fer un trasplantament malgrat la presència de 2 o 3 disparitats antigèniques en les molècules HLA d'un donant.

Tot i així, en el context d'un TPH al·logènic a partir d'un germà HLA-idèntic, també s'observa una elevada incidència de MECH no atribuïble a aquestes disparitats, el que va fer pensar en l'existència d'altres factors que, de manera menys significativa que les diferències HLA, estiguessin implicats en l'evolució de MECH post-trasplantament, d'acord amb el tercer postulat de *Billingham*.

*Barrett* i col·laboradors van descriure la base molecular i cel·lular dels mecanismes d'al·lorespostes immunitàries, amb aquesta eina van poder veure que gens codificants per citocines, mecanismes implicats en la homeòstasi immunitària, gens implicats en la reconstitució immunològica així com gens involucrats en la immunosupressió estaven relacionats amb l'aparició de MECH i ECL. L'equip de la professora *Dickinson*, va descriure polimorfismes genètics en gens no-HLA, com les citocines, que determinaven la naturalesa de la reconstitució immunitària post-al·lo-TPH, i que per tant afectarien al resultat clínic (MECH – ECL). Altres gens no-HLA, amb un gran efecte post-al·lo-TPH són els antígens menors d'histocompatibilitat (AgsMH). Es va veure que disparitats en els AgsMH entre donant i receptor podien desencadenar MECH, ECL o bé el rebuig de l'empelt [104]. També s'han descrit polimorfismes en altres gens que s'associen a una major incidència de MECH: gens implicats en les respostes immunitàries innates, gens relacionats amb el metabolisme de fàrmacs, gens implicats en la homeòstasi immunitària, gens codificants per citocines i/o els seus receptors. No obstant els més estudiats en aquests sentit són els antígens menors d'histocompatibilitat [104].

### V.1 ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT

Els antígens menors d'histocompatibilitat es defineixen com a petits pèptids precedents de la degradació de proteïnes endògenes polimòrfiques d'important funció biològica i evolutivament conservades [105].

El primer indici de l'existència dels AgsMH es va originar amb els estudis de *Snell* [106], qui els va descriure com a loci genètics responsables del rebuig de tumors i empelt de pell intercanviats entre diferents soques de ratolins. Aquests estudis pioners van permetre definir l'existència dels AgsMH establint que eren codificats per gens fora del CMH. Per corroborar-ho, *Snell* [107] i *Balley* [108] van produir soques congènites de ratolins que contenien diferents

segments genètics i que van permetre aïllar i mapejar molts dels AgsmH coneguts fins al moment.

A partir del 1980, l'increment de trasplantaments de moll d'os a partir d'un donant HLA-idèntic va ser notable, i va permetre il·lustrar que aquestes entitats del receptor reconegudes pels limfòcits T del donant, eren capaces d'iniciar dues respostes, la MECH i l'ECL [105].

Gran part de les investigacions relacionades amb la identificació molecular dels AgsmH té com a objectiu alleujar o prevenir la MECH. En els últims anys, el coneixement de l'efecte ECL ha donat gran ímpetu a la investigació sobre AgsmH i immunoteràpia del càncer, amb l'esperança de generar cèl·lules reactives dirigides cap a AgsmH concrets amb l'objectiu d'eradicar tumors.

Inicialment, els AgsmH eren definits a nivell cel·lular per estudis de reactivitat de limfòcits T generats durant la MECH obtinguts en individus immunitzats *in vivo* degut al trasplantament [105].

En aquesta àrea, van ser pioners els treballs de *Goulmy* i col·laboradors [109], els qui, a partir de limfòcits T de SP de diferents receptors, van ser capaços de generar clons de limfòcits T citotòxics restringits a molècules HLA de classe I o HLA de classe II que van permetre, entre altres coses, establir una sèrie de característiques dels AgsmH (autosòmics o codificats pel cromosoma Y, freqüència poblacional, expressió tissular, molècula HLA de restricció, herència mendelinana, etc.). La majoria d'aquests pèptids són autosòmics, distribuïts al llarg de tot el genoma [105]. Les parelles al·lèliques d'AgsmH poden ser molt polimòrfiques com és el cas del gen sexual SMCY, que difereix del seu homòleg en el cromosoma X, SMCX, en més de 200 residus, o pot diferir només en un sol aminoàcid.

S'ha vist també que els AgsmH es poden generar també a partir de la degradació de polipèptids derivats de les zones no codificants del genoma com les regions no transcrites (UTR, de l'anglès "*untranslated region*") o els introns [110].

La majoria de AgsmH identificats es generen a partir de polimorfismes d'un únic nucleòtid (SPN, de l'anglès "*single nucleotide polymorphism*") no sinònim. Els canvis aminoacídics associats a aquests SNPs poden donar lloc a diferents variacions proteiques causant alteracions en la via de presentació antigènica a diferents nivells: en el processament antigènic proteosòmic, en el transport peptídic cap a RE, en la càrrega a les molècules HLA, o en el reconeixement per part del RCT [111].

Els AgsmH es poden classificar en dos grups: mentre que alguns es limiten a cèl·lules de llinatge hematopoètic (com per exemple: HA-1, HA-2, UTA2-1), altres són ubics sense estar restringits a cap tipus de teixit concret (HA-8, HY). La distribució dels antígens juga un paper important en el direccionament de les respostes al·logèniques cap a un efecte MECH o ECL com s'ha comentat prèviament; els antígens menors d'expressió ubiqua desencadenaran reaccions que desenvoluparan MECH, mentre que aquells d'expressió restringida a teixit hematopoètic podran direccionar les reaccions al·logèniques cap a l'eradicació de la malaltia residual. Aquests últims són candidats com a dianes immunoterapèutiques dirigits contra leucèmies, limfomes o mielomes. Es va observar una notable reducció de recidives en pacients sotmesos a un al·lo-TPH que no desenvolupaven MECH comparat amb pacients sotmesos a TPH singènic, el què suggeria que l'efecte ECL es podia separar de MECH [112, 113]. També s'ha vist en humans l'expansió de cèl·lules limfòcits T CD8+ específiques per a HA-1 o HA-2 en sang després d'infondre limfòcits del donant (DLI, de l'anglès "*donor lymphocyte infusion*"). La floració de cèl·lules T específiques per HA-1 o HA-2, coincidia amb les remissions de les corresponents malalties (leucèmia mieloide crònica (LMC) i mieloma múltiple (MM), respectivament) [114, 115].

Una altra estratègia terapèutica és la immunització del donant pre-trasplantament o del receptor mitjançant vacunes a partir de pèptids antigènics, per a potenciar l'efecte ECL després de la infusió dels PH.

La definició molecular dels AgsmH implica l'existència potencial d'un gran nombre d'aquests (Taula annex 1). S'ha descrit recentment, un nou mètode robust per a la identificació d'AgsmH, amb el qual han pogut detectar els AgsmH identificats fins al moment, i a més ha permès identificar un nou AgmH que per ara, amb les eines amb les quals es disposava (estratègies bioquímiques, genètiques o de biologia molecular) no s'havia detectat [116]. No obstant, diverses evidències experimentals i informes clínics indiquen que en realitat, un nombre limitat d'aquests exhibeix potencial immunogènic. Brochu i col·laboradors van estudiar l'expansió de cèl·lules T i el repertori de TCR post-TPH de MO amb combinacions de soques de ratolins on el receptor desenvolupava una MECH severa, per entendre com es responia davant dels AgsmH. Les poblacions de cèl·lules expandides van mostrar citotoxicitat restringida per molècules del CMH cap a un nombre baix de AgsmH [117]. Cal destacar que tot i que dirigides a un sol epítot, no totes les respostes citotòxiques restringides pel CMH són oligoclonals. Estudis amb epítots virals suggereixen que l'oligoclonalitat és característica de la

resposta dels limfòcits T cap a epítops dominants, mentre que la resposta a epítops críptics és policlonal [118].

Diversos estudis han intentat establir mecanismes d'immunodominància entre AgsmH, el que sembla indicar que la diferència entre AgsmH dominants i críptics és l'avidesa diferencial dels limfòcits T citotòxics específics per la CPA. L'alta avidesa d'aquestes interaccions, s'explicarien amb tres característiques dels pèptids dominants: 1) l'alta afinitat d'unió a la molècula HLA que restringeix la seva presentació; 2) la baixa constant de dissociació; i 3) l'elevada densitat d'expressió a superfície cel·lular [119]. Altres treballs han reafirmat el concepte d'immunodominància i jerarquia d'immunogenicitat entre AgsmH, tant en humans com en models experimentals [120, 121].

Disparitats en un únic Ag menor no són suficients per desencadenar MECH en models pre-clínic, inclús quan els Ags són immunodominants, s'ha vist que és necessària la presència addicional d'altres disparitats pel desenvolupament de la complicació [113].

#### **V.1.1 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-1**

El primer antigen menor d'histocompatibilitat descrit no associat al cromosoma Y va ser HA-1. Va ser descobert a partir d'un pacient afecte de leucèmia mieloide aguda (LMA) que va ser sotmès a al·lo-trasplantament de MO a partir d'una germana HLA-idèntica. Aquest pacient va desenvolupar MECH aguda i crònica, que es va atribuir inicialment a les disparitats associades al cromosoma Y entre donant i receptor. Per tractar d'identificar quin AgmH del cromosoma Y estava provocant la resposta es van realitzar assajos de citotoxicitat, els quals van revelar que l'efecte observat era conseqüència de la presència de limfòcits T citotòxics dirigits cap a un altre antigen no lligat al cromosoma Y, que es va denominar antigen d'histocompatibilitat HA-1.

HA-1 és un nonapèptid produït per la degradació de la proteïna endògena codificada pel gen HMHA1 també conegut com KIAA0223 (cromosoma 19). La seqüència aminoacídica del qual és VLHDDLLEA. La forma no antigènica de HA-1 és VLRDDLLEA. Aquest canvi aminoacídic es deu a la presència d'un SNP (rs1801284), que comporta el canvi d'una guanina (G) per una adenina (A), que es tradueix en un canvi d'una histidina (H) per una arginina (R) en la tercera posició aminoacídica [122].

La forma antigènica, o dit d'una altra manera, aquella que originarà una resposta immunitària, és la seqüència aminoacídica que conté la H, i s'anomena HA-1<sup>H</sup>, mentre que la forma no antigènica es denomina HA-1<sup>R</sup> [122].

L'expressió de HA-1 està restringida a teixit hematopoètic (tot i que també s'ha detectat en cèl·lules epitelials tumorals i cèl·lules epitelials anormals) [123] i és expressat mitjançant una molècula HLA-A\*02:01; tot i que més recentment s'ha vist que també pot estar vehiculitzat per HLA-A\*02:06 [124] o HLA-B\*60 [125]. S'ha demostrat la immunodominància de HA-1 sobre altres antígens menors [115]. Aquestes característiques, juntament amb les seves freqüències poblacionals han convertit aquest AgmH en un bon candidat per a ser considerat en el context d'al·lo-TPH. Alguns grups de recerca han estudiat l'efecte de la disparitat HA-1 entre donant i receptor en la relació al desenvolupament de MECH i al pronòstic clínic post-al·lo-TPH. No obstant, les conclusions a les que han arribat aquests grups no han estat sempre les mateixes [126-130].

La condició de disparitat, ve donada quan, el receptor presenta el pèptid antigènic (en aquest cas un al·lel HA-1<sup>H</sup>) ja sigui en homozigosi o en heterozigosi, i no hi sigui present en el donant (que en aquest cas ha de ser homozigot per l'al·lel HA-1<sup>R</sup>).

### V.1.2 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-2

HA-2 va ser el primer antigen menor d'histocompatibilitat caracteritzat a nivell peptídic en éssers humans [122, 131]. Va ser descobert a partir d'un pacient que va desenvolupar MECH severa després de rebre un trasplantament de moll d'os a partir d'un germà HLA-idèntic [131]. HA-2 ve codificat pel gen dialèl·lic MYO1G, que pertany a la família de la miosina, i mapa al braç curt del cromosoma 7. L'expressió d'aquest gen queda limitada a cèl·lules de llinatge hematopoètic i ve restringit per les molècules HLA-A\*02:01. S'han identificat dues variants genètiques, designades MYO1G(V) i MYO1G(M); la primera, codifica pel pèptid immunogènic (HA-2<sup>V</sup>), la seqüència aminoacídica del qual és YIGEVLVSV, i la segona codifica per YIGEVLVSM (HA-2<sup>M</sup>); aquest canvi aminoacídic de valina (V) a metionina (M) s'origina per la presència d'un SNP (rs61739531) que comporta un canvi de citosina (C) a timina (T) [132, 133]. Aquest canvi es tradueix a un modest efecte en la càrrega del pèptid en les molècules HLA-A\*02:01, i té un petit impacte en el reconeixement per part de les cèl·lules T [132].

La condició de disparitat per HA-2 té lloc quan el receptor és homozigot o heterozigot per HA-2<sup>V</sup>, i el donant homozigot per HA-2<sup>M</sup>.

Tot i que la freqüència genotípica de HA-2V és del 95% en la població HLA-A\*02:01 positiva, i fa d'aquest antigen menor d'histocompatibilitat un bon candidat per ser considerat en immunoteràpia en el context d'un al·lo-TPH, sembla ser menys immunogènic que HA-1 i ha estat estudiat en menys profunditat com per determinar el seu paper en el context al·logènic [134].

### V.1.3 Antigen menor d'histocompatibilitat: HA-8

*Brickner* i col·laboradors van identificar l'antigen menor HA-8, i el van anomenar seguint la nomenclatura proposada per *Goulmy*. El nonapèptid, RTLDKVLEV, deriva del gen KIAA0020, localitzat en el cromosoma 9. Els al·lells polimòrfics d'aquest gen codifiquen per seqüències alternatives RTLDKVLEV i PTLDKVLEV, essent el primer el pèptid antigènic. Aquest canvi d'una arginina (R) per una prolina (P) és degut a un polimorfisme nucleotídic que comporta un canvi de guanina (G) a citosina (C) respectivament. Inicialment es va veure que el pèptid PTLDKVLEV no era reconegut per LTC, pel que es va hipotetitzar que es devia a una proteòlisi ineficient de la proteïna o a una translocació defectuosa del pèptid a l'interior del RE, situacions que originen una presentació antigènica diferent [135]. Estudis posteriors van demostrar el pèptid HA-8<sup>P</sup> no és transportat eficientment per la proteïna TAP. Aquest estudi també revela que les diferències d'immunogenicitat entre AgsmH poden sorgir també d'un processament alterat de les proteïnes que originen aquests AgsmH [105]. En la bibliografia hi ha pocs estudis clínics que relacionin l'impacte d'HA-8 en al·lo-TPH.

La condició de disparitat es dona quan el donant és HA-8<sup>P</sup>/HA-8<sup>P</sup>, i el receptor HA-8<sup>P</sup>/HA-8<sup>R</sup> o HA-8<sup>R</sup>/HA-8<sup>R</sup>.

L'expressió d'aquest Agm és ubica en tots els teixits inclòs l'hematopoètic, i ve restringida per les molècules HLA-A\*02:01.



#### V.1.4 Antigen menor d'histocompatibilitat: UTA2-1

*Oostvogels* i col·laboradors han descobert recentment un nou antigen menor d'histocompatibilitat al que van anomenar UTA2-1. Aquest està vehiculitzat per les mol·lècules HLA-A\*02:01, i queda restringit a cèl·lules del teixit hematopoètic. Aquest descobriment es va fer a partir d'un pacient afecte de mieloma múltiple (MM) que va desenvolupar MECHa grau I, després de ser sotmès a un al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic amb previ acondicionament mieloablatiu. El pacient va recidivar al cap de dos anys, pel que se'l va infondre amb limfòcits del donant inicial (DLI:  $1 \times 10^7$  T cèl·lules/kg) amb resultats desencoratjadors. Es va decidir fer una segona DLI en dosis més elevades ( $5 \times 10^7$  T cèl·lules/kg) amb el qual s'aconseguí una resposta ECL, resultant en remissió complerta [136].

UTA2-1 és un pèptid polimòrfic codificat pel gen dial·lèlic C12orf35, situat al cromosoma 12. Els al·lels polimòrfics d'aquest gen codifiquen per dues seqüències alternatives que difereixen en la tercera posició aminoacídica: QLPNSVLTL (UTA2-1<sup>P</sup>) and QLLNSVLTL (UTA2-1<sup>L</sup>), essent la segona el pèptid immunogènic. La disparitat de UTA2-1 ve definida per la presència del pèptid immunogènic en el receptor ja sigui en homozigosi o heterozigosi (UTA2-1<sup>L</sup>/UTA2-1<sup>L</sup> o UTA2-1<sup>L</sup>/UTA2-1<sup>P</sup>), i la seva absència en el donant (UTA2-1<sup>P</sup>/UTA2-1<sup>P</sup>)[137].

Aquest Agm ha estat proposat com a possible eina immunoterapèutica degut a les següents característiques: la seva freqüència fenotípica, restricció a cèl·lules de llinatge hematopoètic per molècules HLA-A\*02:01, i també se n'ha observat la seva expressió en cèl·lules canceroses [136].

#### V.1.5 Antígens menors d'histocompatibilitat: HY

El primer model biològic en el que es descrivia un rebuig d'un empelt, degut a disparitats de sexe va ser en ratolins. Al la dècada dels 50, *Eichwald* i col·laboradors van veure que empelts de pell de donants mascles a receptors femella tenien la major taxa de rebuig de totes les combinacions de gèneres possibles amb les que havien treballat, amb el que van predir que la femella quedava sensibilitzada als antígens del cromosoma Y, el que conduïa al rebuig de l'empelt. Estudis addicionals reportats per l'equip de *Billingham*, mostraven que aquest efecte es podia evitar sensibilitzant a les femelles mitjançant la infusió de cèl·lules del donant en el

moment del naixement. Aquests estudis van ser els primers en identificar la importància de les disparitats de sexe en els transplantaments [138].

Quan fem referència a AgsmH HY s'engloben a tots els AgsmH generats pel cromosoma Y (USP9Y, SMCY, TMSB4Y, UTY i RPS4Y1) [139]. Tots aquests antígens s'han localitzat a la banda 11 del braç llarg del cromosoma Y. La majoria dels AgsmH HY procedeixen de la degradació de proteïnes implicades en l'espermatogènesi i s'expressen de manera ubica. L'element de restricció d'aquests antígens és variable, tot i que la majoria venen vehiculitzats per molècules HLA de classe I, també s'han descrit molècules HLA de classe II. Aquests AgsmH han estat relacionats amb un increment de MEChA i amb una pitjor supervivència global en presència de disparitat entre donant i receptor [139]. La condició de disparitat en aquest cas, ve definida quan el receptor és un home (presència de pèptids antigènics) i el donant una dona (absència dels pèptids).

## V.2 CTLA-4: CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ASSOCIATED PROTEIN-4

És conegut que la funció principal de CTLA-4 és reclutar fosfatases per a la defosforil·lació de molècules de senyalització primerenca, no obstant, encara es desconeix quina funció té l'acoblament d'aquestes fosfatases en l'activitat immunosupressora de CTLA-4. Són molts els grups de recerca que tenen CTLA-4 en el punt de mira, doncs com s'ha comentat anteriorment, la translocació d'aquesta proteïna a la superfície cel·lular és necessària per a la terminació de les respostes immunitàries i pel manteniment de la homeòstasi limfocitària.

En el context d'un al·lo-TPH, en el qual les diferències antigèniques entre donant i receptor són considerables, i l'al·loreconeixement és un procés freqüent, la incapacitat dels limfòcits d'inactivar-se pot traduir-se en l'aparició de malaltia d'empelt contra l'hoste. Per aquest motiu, CTLA-4 és una bona molècula candidata per ser estudiada en aquest context.

CTLA-4 és un gen que codifica per una glicoproteïna transmembrana de 223 aa, que mapa a la banda q33-34 del cromosoma 2. Aquest gen es compon de 4 exons: l'exó 1 dona lloc al pèptid "*leader*" de direccionament cap a RE, l'exó 2 codifica part de la part extracel·lular de la proteïna en la que es localitza el domini MYPPPY de unió a B7, l'exó 3 codifica pel domini hidrofòbic transmembrana i l'exó 4, que es tradueix en la cua citoplasmàtica de la glicoproteïna [140].

El gen CTLA-4 pot ser traduït en dues isoformes proteiques degut a *splicing* alternatiu: fICTLA-4 (de l'anglès “*full-length CTLA-4*”) i sCTLA-4 (de l'anglès “*soluble CTLA-4*”).

La primera isoforma és una proteïna homodimèrica d'uns 41-43 KDa. Jago i col·laboradors, van estudiar la cinètica de CTLA-4 basant-se en les paraules de Linsley: L'expressió de CTLA-4 a la superfície cel·lular ve regulada dinàmicament pel seu trànsit entre els dipòsits intracel·lulars i la superfície de la cèl·lula [141]. CTLA-4 es presenta constitutivament en els limfòcits T reguladors però és pràcticament indetectable en altres subpoblacions de limfòcits T. No obstant, s'ha vist que després d'una activació limfocitària, els nivells d'aquesta isoforma incrementa significativament en els limfòcits T memòria. Aquests, presenten un emmagatzematge intracel·lular en vesícules intra-citoplasmàtiques, que permeten que sigui translocat ràpidament a la superfície cel·lular un cop s'activa la resposta immunitària.

La segona isoforma, encara força desconeguda, podria ser utilitzada com a marcador de respostes immunitàries [140]. Va ser descrita per primera vegada al 1997, com una proteïna immunològicament activa en sèrum expressada per limfòcits T no estimulats, el que es va desmentir més tard al veure que la presència de sCTLA-4 era indetectable en voluntaris sans. No obstant, si que es van detectar certs nivells de proteïna soluble en pacients afectes de determinades malalties autoimmunitàries [142-144].

Recentment s'ha observat que la cinètica d'expressió de les dues isoformes és seqüencial [145].

### V.2.1 Polimorfismes genètics de CTLA-4

S'han identificat varis SNPs en CTLA-4 dels quals només 6 s'han estudiat en el context de desordres autoimmunitaris. Tres d'aquests SNPs els trobem localitzats al promotor en posició -1722, -1661 i -318, a l'exó 1 hi trobem una mutació “*missense*” en posició +49 que provoca una substitució aminoacídica d'una alanina (A) per una treonina (T) en el pèptid “*leader*” de direccionament cap a RE, i els SNPs anomenats CT60 i de repetició (AT)<sub>n</sub>, situats a la regió 3'UTR (de l'anglès “*untranslated region*”). Varis grups han identificat els al·lels citosina (C) i adenina (A) d'aquests SNPs com a protectors davant de determinades malalties autoimmunitàries, mentre que els al·lels timina (T) i guanina (G) es consideren de risc o de susceptibilitat davant d'aquestes malalties [146-149].

El nostre grup va estudiar la influència de 5 d'aquests polimorfismes de CTLA-4 (-1722, -1661, -318, +49 i CT60) en el resultat clínic de pacients que havien estat sotmesos a un al·lo-TPH a partir d'un donant HLA-idèntic, doncs fins al moment no hi havia estudis descrits en la literatura que relacionessin cap d'aquests SNPs en aquest context. Es va observar que CT60 tenia un efecte dominant en el resultat del transplantament, identificant-se l'al·lel G com a factor de risc independent associat a un increment de recidives, i a una disminució de MECHa i de la supervivència global. També es van analitzar els nivells en donants sans d'RNA missatger de sCTLA-4 i es va identificar l'al·lel A com a responsable d'una major producció de sCTLA-4; el que suggereix que aquest SNP podria determinar l'eficiència del procés d'*splicing* alternatiu i la producció de la isoforma soluble de CTLA-4 [147, 150]

L'SNP +49 és l'únic d'aquests polimorfismes que varia la seqüència aminoacídica de CTLA-4. Estudis *in vitro* han demostrat que l'expressió de CTLA-4 pot veure's reduïda degut a una ineficient glicosilació en el RE degut a la forma polimòrfica de +49G [151]. Per altra banda, estudis del polimorfisme -318 (C/T) han demostrat que la variant T s'associa a una major activitat del promotor del CTLA-4 i com a conseqüència a una major expressió del mateix [152]. Aquest mateix polimorfisme, juntament amb -1722 (C/T) han estat relacionats amb el control de la transcripció de CTLA-4 [145]. Així mateix, la repetició (AT)<sub>n</sub> s'ha relacionat amb la intensitat de les respostes immunològiques, la repetició d'ATs és directament proporcional a la taxa de proliferació, al ser estimulats amb anticossos anti-CD3 i anti-CD28. Mentre que el polimorfisme -1661 (A/G) ha estat menys caracteritzat, tot i que s'ha descrit que la variant -1661G és més elevada en pacients amb colitis ulcerosa que en donants sans de manera significativa [153], fins al moment no es poden definir els seus efectes en l'expressió de CTLA-4.

Tot apunta a que aquests SNPs confereixen sensibilitat a desordres autoimmunitaris.

### V.3 ALTRES POLIMORFISMES ASSOCIATS A L'APARICIÓ DE MECH

S'han descrit altres gens que s'han implicat en l'aparició de malaltia d'empelt contra l'hoste, com els que codifiquen per citocines o pels seus receptors [154, 155].

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-10, interferó  $\gamma$  i IL-6 s'han associat a una MECHa severa. El genotip del donant de la interleucina-1 antagonista pel receptor (IL-1Ra) s'ha associat a una

disminució de la severitat de MECHa; altres genotips s'han associat amb l'aparició de MECHc (com per exemple: pacient IL-1Ra, IL-6 i donant IL-1 $\alpha$ ), o supervivència global (com és el cas del receptor de vitamina D i estrògens). També polimorfismes en gens relacionats amb respostes inflamatòries (com les unions de manoses dels gens de les lectines, gens de mieloperoxidasa i receptors FC $\gamma$ ) s'han associat a infeccions; així com gens relacionats amb el metabolisme dels fàrmacs com és el cas del gen metilentetrahidrofolat-reductasa relacionat amb l'aparició de MECHa i altres complicacions post-trasplantament. També polimorfismes en el gen NOD2, associat a la malaltia de Crohn, ha mostrat associació amb un major risc de desenvolupar MECH [154].

En aquest projecte de tesi doctoral, s'han estudiat únicament els antígens menors d'histocompatibilitat vehiculitzats per les molècules HLA-A\*02:01 descrits fins al 2012 i el gen associat al control de les respostes immunitàries CTLA-4.



# Hipòtesi i objectius

---

*"Si no saps on vas, acabaràs a un altre lloc"*

*Peter Laurence Johnston*





## HIPÒTESI

La hipòtesi del present treball és que les disparitats en antígens menors d'histocompatibilitat tenen un impacte en el resultat clínic de trasplantament al·logènic a partir d'un germà HLA-idèntic; i que els limfòcits T del donant podrien estar modulant la resposta immunitària davant d'aquestes disparitats, inclús, quan el pacient rep un empelt lliure de limfòcits T per selecció positiva de CD34.

## OBJECTIUS

### OBJECTIUS PRINCIPALS

- 1) Analitzar si les disparitats en HA-1, HA-2, HA-8, HY i UTA2-1 entre donant i receptor tenen un impacte en la malaltia d'empelt contra l'hoste
- 2) Determinar si els polimorfismes de CTLA-4 dels limfòcits T del donant poden estar modulant la resposta immunitària davant de disparitats conegudes en AgsmH
- 3) Avaluar si els polimorfismes de CTLA-4 dels limfòcits T del donant tenen un impacte en MECH quan el donant rep un empelt lliure de cèl·lules T

### OBJECTIUS SECUNDARIS

- 1) Analitzar les freqüències al·lèliques i genotípiques de HA-1, HA-2, HA-8, HY i UTA2-1 , així com la freqüència de disparitats entre donant i receptor
- 2) Determinar si les disparitats en els AgsmH tenen un impacte en altres variables clíniques: supervivència global (SG), supervivència lliure de malaltia (SLM), recidives o mort relacionada amb el trasplantament (MRT)
- 3) Avaluar si existeix efecte acumulatiu de les disparitats d'AgsmH entre donant i receptor

- 4) Determinar les freqüències al·lèliques i genotípiques dels polimorfismes de CTLA-4 en els donants.
- 5) Determinar si els polimorfismes de CTLA-4 dels limfòcits T del donant poden tenir un impacte, davant de disparitats conegudes en AgsmH, en altres variables clíniques (SG, recidives o MRT)
- 6) Avaluar si els polimorfismes de CTLA-4 dels limfòcits T del donant tenen un impacte en altres variables clíniques quan el donant rep un empelt amb depleció exhaustiva de cèl·lules T

# Materials i mètodes

---

*“El més important no és fer coses noves, sinó fer-les  
com si mai ningú les hagués fet abans”*

*Antonio Machado*



# I-ESTRUCTURACIÓ DEL TREBALL

En aquest treball s'aborden tant els antígens menors d'histocompatibilitat com la modulació de la resposta immunitària per part de CTLA-4, essent d'interès per a una millor selecció de donant (en cas de disposar-ne de més d'un) o per adequar les pautes de profilaxis farmacològica, o inclús els criteris per la manipulació de l'empelt en forma de depleció de limfòcits T ajustant-lo al perfil genòmic d'alt o baix risc per al desenvolupament de malaltia d'empelt contra l'hoste.

Amb el propòsit de simplificar els resultats, s'ha dividit el treball en tres apartats:

- I. Antígens menors d'histocompatibilitat
- II. Modulació de la resposta immunitària segons el genotip de CTLA-4 davant de disparitats conegudes
- III. Impacte dels polimorfismes de CTLA-4 en el context de depleció T

## II-POBLACIÓ D'ESTUDI

Aquest estudi consisteix en l'anàlisi de polimorfismes d'un únic nucleòtid (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) en els antígens menors d'histocompatibilitat mencionats anteriorment, i dels polimorfismes de la molècula CTLA-4, a partir de mostres de sang perifèrica i moll d'os de pacients i donants implicats en un al·lo-HSCT.

El grup de recerca d'Hemopaties Malignes de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi) té accés a 2045 parelles de donant-receptor procedents dels hospitals membres del GETH (Grup Espanyol de Transplantaments Hematopoètics, Taula annex 2), que estan essent recol·lectades des de 1991.

Per tal de participar en l'estudi, tots els voluntaris han donat el seu consentiment per escrit, conforme amb l'estipulat en la declaració d'*Helsinki*.

### II.1 ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT VEHICULITZATS PER MOLÈCULES HLA-A\*02:01

Per tal d'analitzar l'efecte que poden tenir les disparitats entre donant i receptor en el resultat clínic d'un trasplantament de progenitors hematopoètics, hem establert uns criteris d'inclusió amb l'objectiu d'homogeneïtzar la població d'estudi.

Les parelles incloses en l'anàlisi estadístic han estat sotmeses a un trasplantament de progenitors hematopoètics de tipus al·logènic a partir d'un donant familiar HLA-idèntic. Les disparitats en molècules HLA generen respostes al·loreactives que desencadenen en MECH. Degut a que un dels objectius del treball és veure l'efecte dels AgsmH en aquesta complicació, eliminem les disparitats entre pacient i donant en molècules HLA que emmascararien l'efecte dels antígens objecte d'estudi. Només s'han considerat les parelles HLA-A\*02:01 positives per a la genotipació dels AgsmH, la resta de parelles s'han considerat negatives degut a l'absència de la molècula HLA de restricció. S'ha decidit contemplar només aquelles parelles en les quals el pacient ha rebut l'empelt no manipulat per l'anàlisi d'AgsmH, de manera que manté totes les cèl·lules immunocompetents del donant capaces d'iniciar respostes d'al·loreactivitat.

Les característiques de la població inclosa en l'estudi d'AgsmH es recullen a la Taula 2. El total de la població per a cada antigen menor difereix degut a problemes adjacents a la tècnica.

Essent la cohort d'HA-1 d'un total de 1211 parelles, 1098 parelles per HA-2, 1179 per HA-8 i per UTA2-1, 1041.

**Taula 2:** Característiques de la població incloses en l'estudi dels AgsmH

Cohort	1392
Edat (mitja; rang)	40.02 (0-72)
Sexe (home:dona)	844 (60.6%):548 (39.4%)
Diagnòstic	
LAL	215 (15.5%)
LAM	387 (27.9%)
LMC	226 (16.3%)
AAS	59 (4.3%)
MM	101 (7.3%)
LNH	191 (13.8%)
Hodgkin	50 (3.6%)
SMD	115 (8.3%)
Mielofibrosis	9 (0.6%)
Altres	32 (2.4%)
Fase malaltia (precoç:avançada)	743 (59.9%): 498 (40.1%)
Font de PH (sang perifèrica:moll d'os)	925 (66.5%): 465 (33.5%)
Acondicionament (mieloablatiu:RIC)	938 (68.3%): 435 (31.7%)
Disparitat de sexe (disparitat:no disparitat)	372 (26.8%): 1018 (73.2%)
Disparitat HA-1 (disparitat:no disparitat)	83 (6.9%): 1018 (93.1%)
Disparitat HA-2 (disparitat:no disparitat)	26 (2.4%): 1072 (97.6%)
Disparitat HA-8 (disparitat:no disparitat)	96 (8.1%): 1083 (91.9%)
Disparitat UTA2-1 (disparitat:no disparitat)	20 (1.9%): 1021 (98.1%)
Donant sensibilitzat (sensibilitzat:no sensibilitzat)	201 (19.5%): 828 (80.5%)
Profilaxis MECH	
No profilaxis	4 (0.3%)
CSA	70 (52%)
CSA +MTX	1114 (83.4%)
CSA + corticoides	28 (2.2%)
Altres	119 (8.9%)
TBI (Quimioteràpia + TBI: Quimioteràpia)	991 (73%): 367 (27%)

LAL indica leucèmia limfàtica aguda; LAM, leucèmia mieloide aguda; LMC, leucèmia mieloide crònica; AAS, anèmia aplàsica severa; MM, mieloma múltiple; LNH, limfoma no Hodgkin; SMD, síndrome mielodisplàstica. S'ha considerat fase de la malaltia avançada després de la primera remissió completa en els pacients amb LA, després de la primera fase crònica en pacients amb LMC, i malaltia progressiva en pacients amb SMD, MM o limfoma. PH fa referència a progenitors hematopoètics; SP, a sang perifèrica, MO, moll d'os; RIC de l'anglès "*reduced-intensity conditioning*", CSA, ciclosporina A; MTX, metotrexat; TBI, de l'anglès "*total body irradiation*".

## **II.2 IMMUNOMODULACIÓ DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES**

És conegut que CTLA-4 juga un paper important en la inhibició de les respostes immunitàries mitjançant la interacció competitiva amb les molècules B7 i la conseqüent interrupció de senyals coestimuladores mediatees per CD28. Els polimorfismes de CTLA-4 han estat relacionats prèviament amb malalties autoimmunitàries, predisposició a recaigudes de leucèmies, amb MECH o recidives post-al·lo-TPH.

S'ha analitzat l'efecte dels polimorfismes de la molècula CTLA-4 del limfòcits T del donant en la immunomodulació davant les disparitats conegudes dels AgsmH, en el context d'un al·lo-TPH a partir d'un donant HLA-idèntic. Per a aquest propòsit, la població seleccionada contenia les característiques recollides a la Taula 3.

## **II.3 POLIMORFISMES DE CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ DE CÈL·LULES T**

CTLA-4 és expressat en els limfòcits T, un dels objectius d'aquest treball ha estat determinar quin efecte podrien tenir els genotips dels polimorfismes CT60 i +49 de CTLA-4 en el resultat clínic post-al·lo-TPH inclús després de la depleció exhaustiva de cèl·lules T mitjançant selecció positiva de CD34. Les característiques de la població inclosa en aquest anàlisi es recullen a la Taula 4.



**Taula 3:** Característiques de la població incloses en l'estudi d'immunomodulació dels SNPs de CTLA-4

Cohort	1295
Edat (mitja; rang)	40 (1-72)
Sexe (home:dona)	792 (61.2%): 503 (38.8%)
Diagnòstic	
LAL	205 (15.8%)
LAM	351 (27.1%)
LMC	208 (16.1%)
AAS	56 (4.3%)
MM	94 (7.3%)
LNH	173 (13.4%)
Hodgkin	50 (3.9%)
SMD	110 (8.5%)
Mielofibrosis	8 (0.7%)
Altres	40 (2.9%)
Fase malaltia (precoç:avançada)	688 (59.9%): 460 (40.1%)
Font de PH (sang perifèrica:moll d'os)	829 (64.1%): 466 (35.9%)
Acondicionament (mieloablatiu:RIC)	871 (68.3%): 404 (31.7%)
Disparitat de sexe (disparitat:no disparitat)	346 (26.8%): 947 (73.2%)
Disparitat HA-1 (disparitat:no disparitat)	77 (7.3%): 980 (92.7%)
Disparitat HA-8 (disparitat:no disparitat)	88 (8.6%): 935 (91.4%)
Profilaxis MECH	
No profilaxis	4 (0.4%)
CSA	129 (12.3%)
CSA +MTX	791 (75.7%)
CSA + cortocoides	47 (4.5%)
Altres	33 (7.1%)
TBI (Quimioteràpia + TBI: Quimioteràpia)	363 (34.0%): 704 (66.0%)

LAL indica leucèmia limfàtica aguda; LMA, leucèmia mieloide aguda; LMC, leucèmia mieloide crònica; AAS, anèmia aplàsica severa; MM, mieloma múltiple; LNH, limfoma no Hodgkin; SMD, síndrome mielodisplàstica. S'ha considerat fase de la malaltia avançada després de la primera remissió completa en els pacients amb LA, després de la primera fase crònica en pacients amb LMC, i malaltia progressiva en pacients amb SMD, MM o limfoma. PH fa referència a progenitors hematopoètics; SP, a sang perifèrica, MO, moll d'os; RIC de l'anglès "*reduced-intensity conditioning*", CSA, ciclosporina A; MTX, metotrexat; TBI, de l'anglès "*total body irradiation*".

**Taula 4:** Característiques de la població seleccionada per a l'anàlisi de la influència dels genotips CT60 i +49 de CTLA-4 post al·lo-TPH post- selecció positiva de CD34

Cohort	136
Edat (mitja; rang)	40 (17-59)
Edat del donant (mitja; rang)	41 (15-64)
Sexe (home:dona)	75 (55.1%): 61 (44.9%)
Diagnòstic	
LAL	16 (11.8%)
LAM	63 (46.3%)
LMC	24 (17.6%)
AAS	1 (0.7%)
MM	8 (5.9%)
SMD	9 (6.6%)
Hodgkin	1 (0.7%)
Mielofibrosis	14 (10.3%)
Altres	0
Fase malaltia (precoç:avançada)	94 (74%): 33 (26%)
Font de PH (sang perifèrica:moll d'os)	136 (100%): 0
Profilaxis MECH	
CSA	81 (59.6%)
CSA +MTX	17 (12.5%)
CSA + corticoides	30 (22.1%)
Altres	8 (5.8%)
TBI	
Cy-TBI	81 (61.8%)
BuCy	23 (17.6%)
BuCy + thiotepa	9 (6.9%)
Cy-TBI-Etoposido	5 (3.8%)
Altres	13 (9.9%)

LAL indica leucèmia limfàtica aguda; LMA, leucèmia mieloide aguda; LMC, leucèmia mieloide crònica; AAS, anèmia aplàsica severa; MM, mieloma múltiple; SMD, síndrome mielodisplàstica. S'ha considerat fase de la malaltia avançada després de la primera remissió completa en els pacients amb LA, després de la primera fase crònica en pacients amb LMC, i malaltia progressiva en pacients amb SMD, MM o limfoma. PH fa referència a progenitors hematopoètics; SP, a sang perifèrica, MO, moll d'os; RIC de l'anglès "*reduced intensity conditioned*", CSA, ciclosporina A; MTX, metotrexat; TBI, de l'anglès "*total body irradiation*"; Cy, ciclofosfamida; Bu, busulfan.

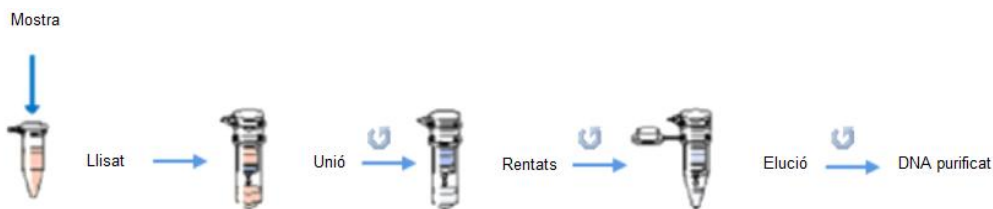
# III-MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA

## III.1 OBTENCIÓ DE DNA A PARTIR DE SANG TOTAL O MOLL D'OS

De cada individu se'n recull un total de 10-20 ml de sang en tubs amb àcid etilen-diamin-tetraacètic (EDTA), per evitar-ne la coagulació; o bé de 3-5 ml d'aspirat medullar.

L'extracció de DNA s'ha dut a terme mitjançant el kit *QIAmp® DNA Blood Mini Kit (250)* (*Qiagen*), seguint les instruccions del fabricant.

La tècnica es basa en cromatografies d'adsorció, en la que els àcids nucleics amb càrrega negativa conferida pels grups fosfats són retinguts a la reïna de la columna subministrada pel *kit* a l'interaccionar amb les càrregues positives de la membrana que aquesta conté. La seva recuperació es basa en l'ús de concentracions alcohòliques decreixents amb les quals es renta la membrana de la columna amb el material genòmic adherit abans de la seva elució final en 200µL d'aigua destil·lada. D'aquesta manera és possible obtenir aproximadament 3 µg de DNA a partir de 200µL de sang total o de 150µL de moll d'os.



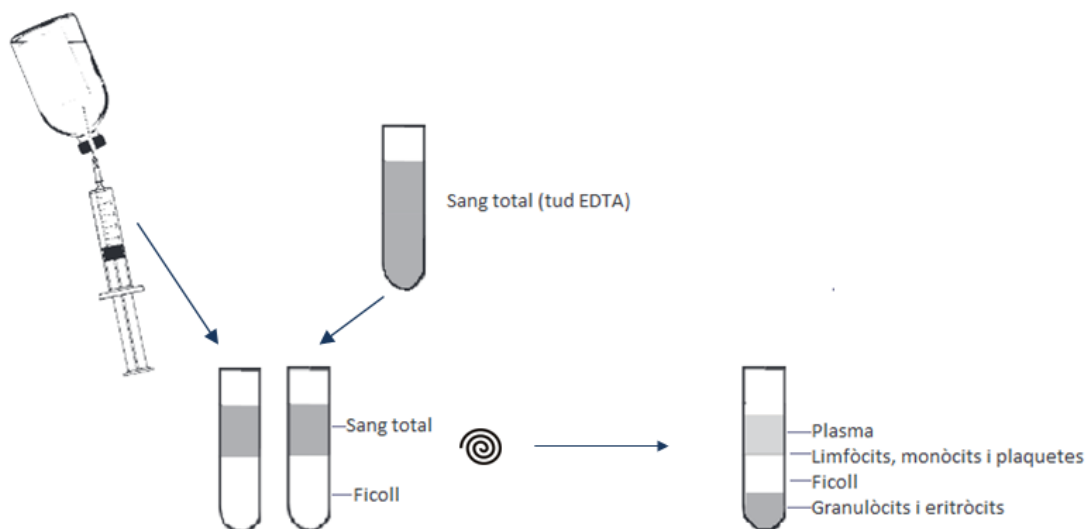
**Figura 14:** Representació esquemàtica de la obtenció de DNA mitjançant el *kit QIAmp® DNA Blood Mini kit (250)*.

Extret de la pàgina oficial de la casa comercial *Qiagen*, i posteriorment modificada [156].

### III.2 OBTENCIÓ DE PELLETS CEL·LULARS

La resta de la sang total és diluïda amb sèrum fisiològic i sotmesa a un gradient de densitat zonal mitjançant *Ficoll-Paque PLUS* (*GE Healthcare*) (Figura 15).

El *Ficoll* és un polisacàrid sintètic d'elevat pes molecular que presenta un alt contingut de grups hidroxil els quals li confereixen bona solubilitat en medis aquosos. A més, no presenta grups ionitzables que puguin servir d'unió a les mostres. És estable a pH neutre i alcalí. Presenta viscositat elevada però no altera la pressió osmòtica del medi. Degut a les seves propietats, el *Ficoll* és molt útil per a la separació de cèl·lules mitjançant centrifugació zonal.



**Figura 15:** Representació esquemàtica del procediment utilitzat per a la obtenció de cèl·lules nucleades mitjançant *Ficoll-Paque PLUS*

Imatges extretes de la pàgina oficial de la casa comercial *GE Healthcare*, i posteriorment modificades [157].

### III.3 AMPLIFICACIÓ DE DNA GENÒMIC SENCER

Per tal de recuperar mostres antigues o de les que no se'n disposa de quantitat suficient, s'ha amplificat el DNA genòmic sencer mitjançant el *kit* d'amplificació *REPLI-G Mini Kit* (100) (*Qiagen*), seguint les instruccions del fabricant.

Aquest procediment es basa en la unió d'hexàmers a l'atzar sobre les cadenes de DNA desnaturalitzades prèviament en un medi moderadament alcalí que permetrà l'amplificació uniforme i fidel dels diferents locus. Aquests hexàmers serveixen d'encebadors per la *Phi29* DNA polimerasa. Aquest enzim és una DNA polimerasa amb activitat exonucleasa 3' → 5' que es va desplaçant al llarg de la cadena motlle a una temperatura constant. La *Phi29* DNA polimerasa ofereix una elevada fidelitat de replicació, a més de ser capaç de resoldre estructures com les forquilles de replicació, que podrien impedir el desplaçament de la polimerasa, la parada de l'activitat i la conseqüent dissociació de la polimerasa durant l'amplificació. Això permet la generació de fragments de DNA de fins a 100 kb sense riscos.



**Figura 16:** Representació esquemàtica de l'amplificació del DNA mitjançant el kit comercial *Repli-g Mini Kit*

La DNA polimerasa *Phi29* es mou al llarg de la cadena motlle de DNA. El desplaçament provocat pels hexàmers es converteixen en un model de replicació que permet uns molt bons rendiments tant a l'hora d'avaluar la puresa com la longitud de la cadena obtinguda. Extret de la pàgina oficial de la casa comercial *Qiagen* [158].

#### III.4 QUANTIFICACIÓ, I DETERMINACIÓ DE PURESA I INTEGRITAT DEL DNA

La concentració del DNA ha estat obtinguda per mètodes espectrofotomètrics mitjançant un *NanoDrop™* (*Thermo Fisher Scientific; Wilmington, EUA*), que permet la valoració de manera ràpida i precisa de la quantitat final d'àcid nucleic a analitzar, així com la seva puresa respecte proteïnes i fenols, al fer incidir sobre la mostra diferents espectres d'absorció dispersa a la dels àcids nucleics (260nm), com 280nm (proteïnes) i 230 nm (fenols).

La integritat del DNA s'ha determinat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa 0.8% tenyit amb un agent intercalant. Com a marcador de pes molecular utilitzem *TrackIt™ λ DNA/Hind III* Fragments (*Invitrogen™*) que comprèn fragments des de 125 pb fins a 23.1 kB.

### III.5 ELECTROFORESI DEL DNA EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi del DNA en gels d'agarosa ofereix un mètode ràpid i senzill de separació i visualització dels fragments d'àcids nucleics amplificats mitjançant PCR. Consisteix en una xarxa tridimensional que permet la separació de fragments de biomolècules, en el nostre cas de DNA, en funció de la seva càrrega, a l'aplicar un determinat voltatge a través d'electrodes.

Els gels s'obtenen a partir de la dissolució d'agarosa en un volum de determinat de tampó TBE (*Tris-borate-EDTA Buffer Bioreagent. Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>). La quantitat d'agarosa a dissoldre i el volum de TBE utilitzat, depèn de la mida dels fragments que es volen separar i de la mida de la cubeta d'electroforesi, a mesura que s'incrementen les longituds d'aquests, es disminueix la quantitat d'agarosa. Per a la visualització de les bandes cal afegir a la solució d'agarosa un agent intercalant (*Midori green; Genetics NIPPON EUROPE GmbH*) abans de que aquesta polimeritzi. Els agents intercalants es situen entre les dues cadenes de DNA, i emet fluorescència al ser exposat a llum ultraviolada, captada per les càmeres del transil·luminador (*Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR+ System with Image Lab<sup>™</sup> Software #170-8195, Bio-Rad*).

## IV-GENOTIPAT DELS AgsmH

Els polimorfismes HA-1 (rs1801284), HA-2 (rs61739531), i HA-8 (rs2173904) han estat genotipats mitjançant SSP-PCR. A més de la tipificació de HA-1 i HA-8 amb SSP-PCR, part de la població també va ser genotipada mitjançant discriminació al·lèlica, tècnica utilitzada també per a resoldre el genotip de UTA2-1 (rs2166807).

### IV.1 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR és una tècnica que permet la síntesi *in vitro* de seqüències específiques de DNA. És una manera senzilla i ràpida de multiplicar el DNA present en diferents mostres biològiques de manera exponencial.

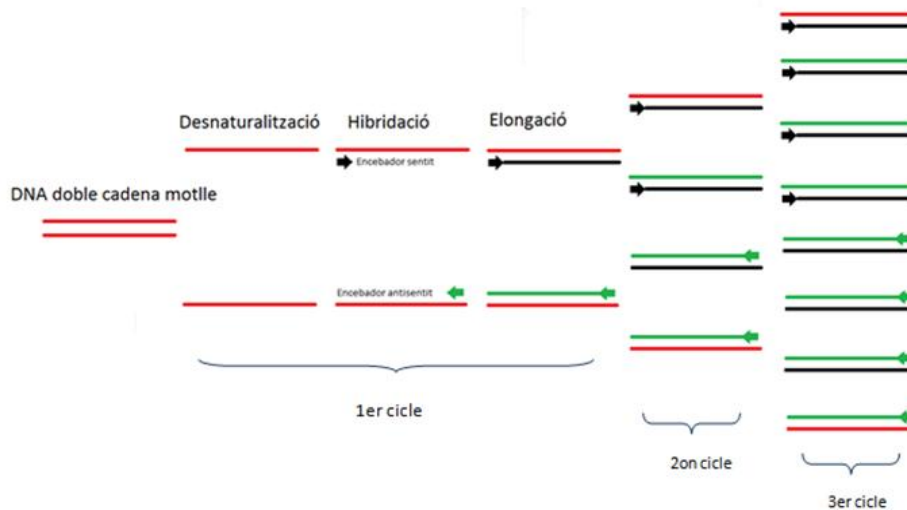
L'inventor d'aquesta tècnica va ser *Kary Mullis* al 1986, per la qual se li va adjudicar el Premi Nobel de Química al 1993.

*Mullis* es va basar en la replicació del DNA en organismes eucariotes realitzada per la DNA polimerasa. Aquest enzim duu a terme la síntesi d'una cadena complementària de DNA en sentit 5' → 3' utilitzant un motlle de cadena senzilla a partir d'una regió de doble cadena. Per tal de crear aquesta regió de doble cadena s'utilitzen els anomenats encebadors, es tracta d'una parella d'oligonucleòtids sintetitzats de manera complementària a cadascun dels extrems del fragment a amplificar.

Partint d'aquest principi, la Reacció en Cadena de la Polimerasa es basa en la repetició d'un cicle format per tres etapes (veure primer cicle Figura 17):

1. Desnaturalització: la doble hèlix de DNA es separa en dues cadenes. Per aconseguir-ho es realitza una incubació a elevades temperatures (93-97°C).
2. Hibridació: els encebadors s'uneixen a les regions que flanquegen el fragment que es vol amplificar per complementarietat de bases. Es realitza gràcies a la baixada de temperatura (50-65°C) fins a la temperatura de *Melting* (*T<sub>m</sub>*: temperatura a la qual el 50% de les molècules de DNA estan en forma de cadena senzilla). Aquesta és específica per a cada encebador i depèn de diversos factors com la longitud dels oligonucleòtids i la proporció de guanines i citosines.

3. **Elongació:** la DNA polimerasa incorpora els deoxinucleòtids a l'extrem 3' de l'encebador i es produeix la síntesi d'una cadena senzilla complementària a la cadena motlle. La temperatura a la que té lloc aquest procés sol ser d'uns 72°C (temperatura òptima per a l'activitat de la DNA polimerasa).



**Figura 17:** Representació esquemàtica del funcionament de la PCR

Es parteix de molècules de DNA de doble cadena. En el primer pas del primer cicle, s'incrementa la temperatura a 93-97°C per tal de provocar la desnaturalització de la doble cadena i obtenir cadenes senzilles de DNA. En el segon pas del primer cicle, es disminueix la temperatura (tenint en compte la  $T^a$  de melting dels oligonucleòtids) fins a obtenir la hibridació dels encebadors amb les seves cadenes complementàries senzilles de DNA. I en el tercer i últim pas, es torna a incrementar la temperatura fins a uns 72°C aproximadament, per tal de que es dongui l'elongació de les noves cadenes de DNA. El cicle es repetirà tantes vegades com sigui necessari, tenint en compte que l'amplificació en cada cicle és exponencial.

#### IV.2 PCR-SSP

La PCR-SSP (de l'anglès "*PCR -Sequence Specific Primers*") és una variant de la PCR de tipus qualitatiu convencional que es basa en el principi de que els encebadors completament coincidents presenten una eficàcia molt elevada en l'amplificació de la seqüència diana. Els parells d'encebadors estan dissenyats per presentar coincidències perfectes només en un únic al·lel o grup d'al·lels. En condicions de PCR estrictament controlades, els parells d'encebadors



perfectament coincidents donen lloc a l'amplificació de les seqüències diana (resultat positiu), mentre que els que no són completament coincidents no generen cap amplicó (resultat negatiu). Per descartar que la no presència d'amplicó es deu a l'absència de la seqüència diana, fem una multiplex, i a cadascuna de les reaccions s'afegeix una parella d'oligonucleòtids que generen l'amplificació d'un control endogen.

*Spierings* i col·laboradors al 2006, van desenvolupar un únic protocol per a l'amplificació de 10 antígens menors d'histocompatibilitat i HY, a partir de PCR d'encebadors específics de seqüència (SSP-PCR). S'han optimitzat les condicions de la tècnica (temperatures i temps de reacció), un altra canvi substancial ha estat canviar el control endogen que proposava el grup dels holandesos (taula annex 3). Com a control endogen de reacció pel polimorfisme antigènic es proposava el gen HPA (de l'anglès "*Human Platelet Antigen*"), que ha estat impossible d'amplificar, de manera que s'ha substituït pel gen HGH2 (de l'anglès "*Human Growth Hormone-2*") , proposat pel mateix grup a l'hora de treballar amb els al·lels no immunogènics, de mida diferent als amplicons d'interès (504pb).

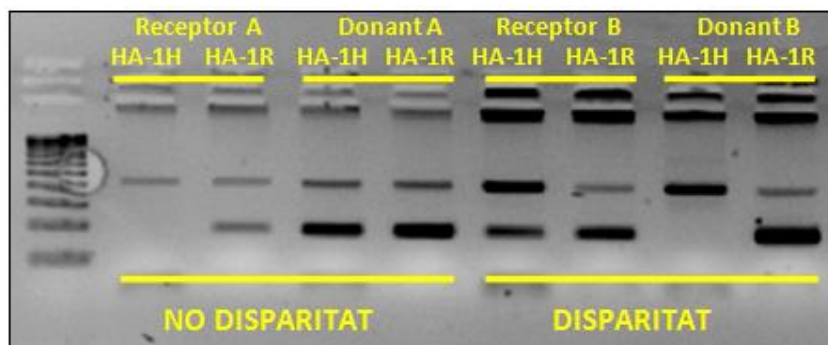
Els productes amplificats han estat resoltos en gels d'agarosa al 2% tenyits amb *midori green*. S'han carregat 3 µl de tampó de càrrega amb 7 µl de producte amplificat en cada un dels pous i sotmesos a un voltatge de 65V durant 25 minuts. Transcorregut aquest temps han estat visualitzats en un transil·luminador (*Molecular Image Gel-Doc XR System, Bio-Rad*).

Per cada mostra s'han preparat dues multiplex, una per a cada al·lel. Les mostres en les que s'ha observat amplificació al·lel-específica en ambdues reaccions, han estat considerades heterozigotes, mentre que les que només han presentat amplificació en una de les dues reaccions, han estat considerades homozigotes per l'al·lel que ha estat reconegut pel parell d'encebadors específics del determinat SNP.

#### IV.2.1 PCR-SSP per HA-1

Es van preparar dues reaccions de PCR per a cada individu mitjançant la *barreja MasterMix 2,5x (5 PRIME Master Mix, VWR)* que ve preparada amb Taq DNA polimerasa, nucleòtids lliures, solució de magnesi i tampó de reacció, a la que només cal afegir els encebadors i aigua lliure de DNAses. L'avantatge de treballar amb la barreja de reacció minimitza els errors i temps de pipeteig així com possibles contaminacions.

Les dues reaccions de PCR realitzades per a cadascuna de les mostres tenen en comú la parella d'encebadors que donaran lloc a l'amplificació del control endògen HGH2, i l'encebador antisentit 3HA-1. En una de les reaccions afegim l'oligonucleòtid 5HA-1H, específic per a l'amplificació de l'al·lel immunogènic, i l'altra, l'encebador sentit 5HA-1R, específic per l'al·lel no immunogènic. Els amplicons corresponents a HA-1 tenen una longitud de 190 pb (Taula annex 4 i Taula annex 5).

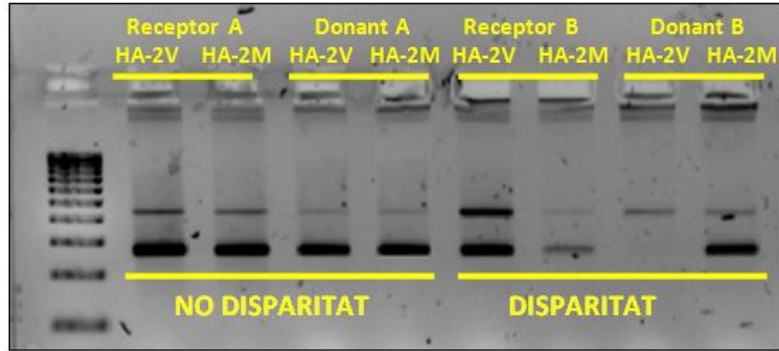


**Figura 18:** Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-1 en gel d'agarosa al 2%

Per cada parella es preparen 4 multiplex, 2 per cada membre. A l'alçada de 500pb hi trobem els amplicons corresponents al control endògen HGH2 (504pb), i a l'alçada dels 200pb, trobem o no els amplicons corresponents a l'SNP en qüestió (190pb), depenent de si hi són o no presents en el genotip. En la parella A (esquerra) el receptor és homozigot per l'al·lel HA-1R, mentre que el donant és heterozigot. En la parella B (dreta) el receptor és heterozigot, mentre que el donant és homozigot per HA-1R, complint la condició de disparitat.

#### IV.2.2 PCR-SSP per HA-2

S'han elaborat dues multiplex per cada mostra i antigen d'estudi, una amb l'encebador antisentit específic per l'al·lel 3HA-2V i un parell d'encebadors específics pel control intern de reacció. L'altra amb l'encebador antisentit específic per l'al·lel 3HA-2M i un parell d'oligonucleòtids específics pel control intern de reacció HGH2. L'encebador sentit (5HA-2), ha estat comú per ambdues reaccions. La mida esperada del fragment amplificat és de 271 pb (Taula annex 4 i Taula annex 5).

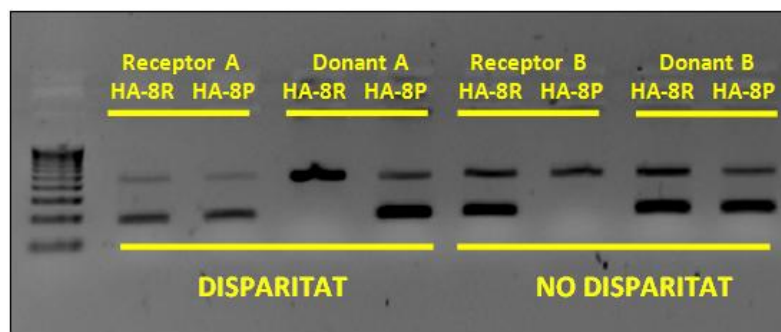


**Figura 19:** Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-2 en gel d'agarosa al 2%

Es preparen 4 multiplex, 2 per cada membre de la parella. A l'alçada de 500pb hi trobem els amplicons corresponents al control endògen HGH2 (504pb), i entre 200 i 300pb s'observaran els amplicons corresponents l'SNP en qüestió (271pb) depenent del genotip de cada individu. En la parella A (esquerra) tant receptor com donant són heterozigots. En la parella B (dreta) el receptor és heterozigot, mentre que el donant és homozigot per HA-2M, complint la condició de disparitat.

#### IV.2.3 PCR-SSP per HA-8

De la mateixa manera, s'han preparat dues reaccions per a cada mostra per al genotipat d'HA-8 que comparteixen la parella d'encebadors corresponents a HGH2 i l'oligonucleòtid antisentit 3HA-8. Per cada reacció se'n varia l'encebador sentit: 5HA-8R, completament coincident amb l'al·lel que dona lloc al pèptid immunogènic, i 5HA-8P, complementari a l'al·lel HA-8P que origina l'amplificació del pèptid no antigènic. L'amplicó corresponent a HA-8 és de 187 pb (Taula annex 4 i Taula annex 5).



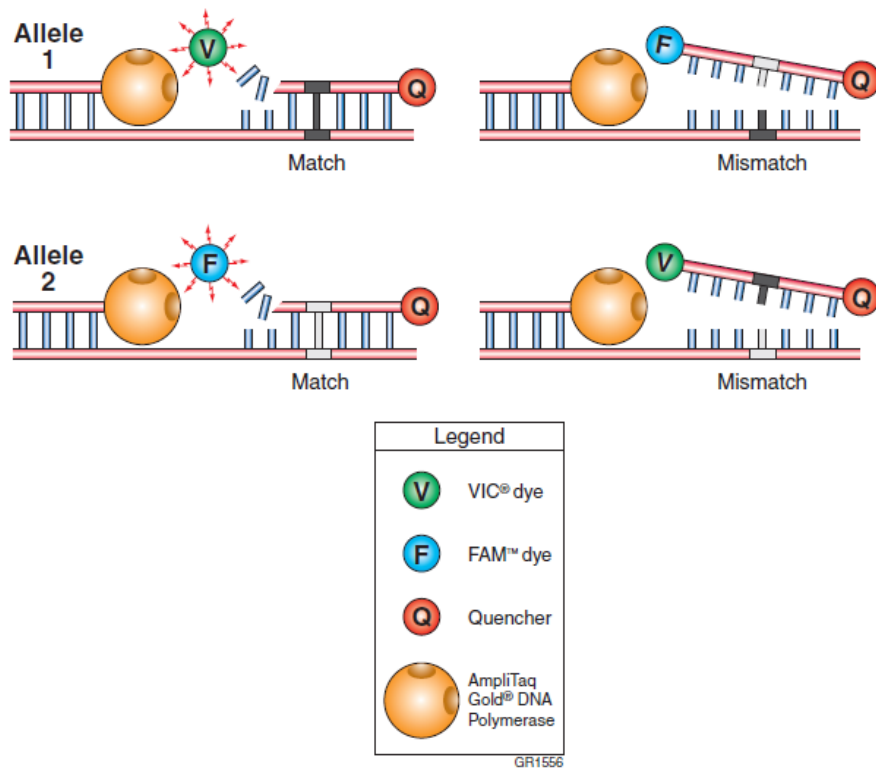
**Figura 20:** Resolució dels productes amplificats per l'SNP HA-8 en gel d'agarosa al 2%

Per a cada individu s'han preparat dues multiplex. A l'alçada de 500pb hi trobem els amplicons corresponents al control endògen HGH2 (504pb), i per sota de 200 pb s'observaran els amplicons corresponents a l'SNP en qüestió (187pb) depenent del genotip de cada individu. En la parella A (esquerra) el receptor és heterozigot mentre que el donant és homozigot per l'al·lel no antigènic, pel que compleixen la condició de disparitat segons definició. En la parella B (dreta) el receptor homozigot per l'al·lel antigènic i el donant heterozigot.

### IV.3 DISCRIMINACIÓ AL·LÈLICA MITJANÇANT PCR A TEMPS REAL

La PCR a temps real és una variant de la PCR convencional amb petites variacions de la tècnica. En primer lloc, a part de la presència de polimerases termòfiles, nucleòtids lliures, tampons, encebadors, aigua i la mostra problema, és necessària la presència de sondes (MGB *probes*) *Taqman*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*; Dinamarca) marcades amb un fluorocrom, de les quals se'n parla més endavant. En segon lloc, el termociclador *ABI PRISM<sup>®</sup>7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*; Dinamarca) en el qual es duen a terme les reaccions d'amplificació, està capacitat d'un làser capaç d'excitar els fluorocroms presents en cadascuna de les reaccions i fer-ne una lectura en el moment que precisi, depenent de la tècnica utilitzada. Una de les tècniques que permet la PCR a temps real és la discriminació al·lèlica (DA), es tracta d'una variant de la PCR a temps real, basada en una reacció multiplex per a cada mostra (més d'un parell d'encebadors/sondes per reacció), on els resultats s'obtenen al final del procés d'amplificació, mitjançant el qual es detecta per emissió de fluorescència les possibles variants d'un nucleòtid en la seqüència d'estudi. Aquesta tècnica permet l'estudi de polimorfismes bi-al·lèlics, tri-al·lèlics i fins i tot tetra-al·lèlics. Els polimorfismes que s'estudien en aquest treball són tots bi-al·lèlics, de manera que l'assaig *Taqman*<sup>®</sup> que s'utilitza està compost per una parella d'encebadors que flanquegen la seqüència que conté el SNP, i dues sondes. Aquestes sondes són seqüències d'uns 50 nucleòtids completament coincidents a les seqüències d'estudi (per un i altre al·lel), amb un fluorocrom en un dels seus extrems i el seu inhibidor específic (*quencher*) en l'altre. Cada assaig conté dos fluorocroms diferents : VIC i FAM (Figura 21).

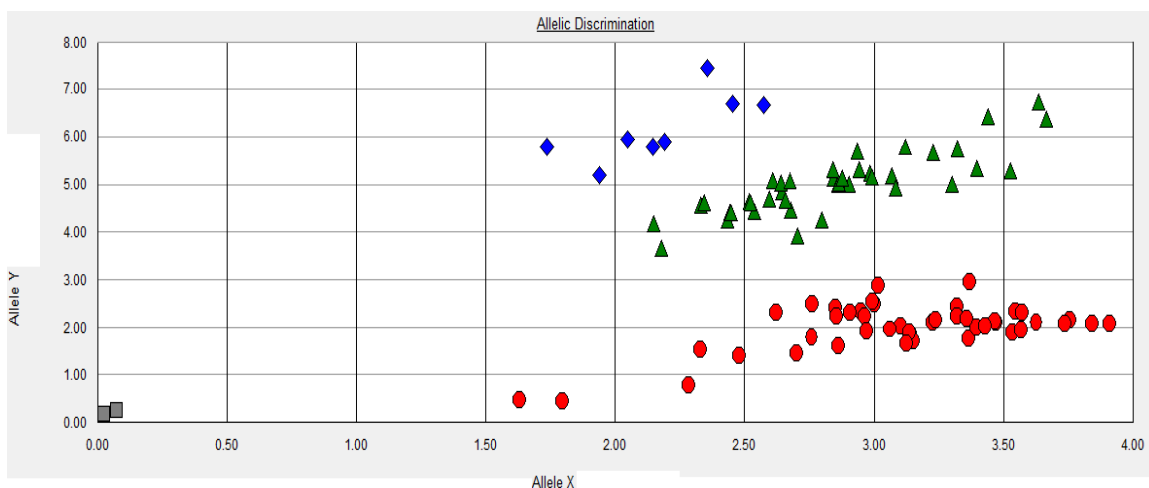
La tecnologia es basa en l'activitat exonucleasa 5' → 3' de la DNA polimerasa per degradar les sondes a mesura que es dona l'elongació de les noves cadenes de DNA. Cada sonda degradada dona lloc a un fluorocrom lliure en el medi allunyat del seu inhibidor. D'aquesta manera, al finalitzar els cicles proposats pel fabricant, es fa una lectura de la fluorescència emesa per cada reacció de PCR de la qual se'n resta la fluorescència basal (llegida al inici del procediment), i el *7000 system software*, classifica les mostres en tres poblacions: homozigotes per un o altre al·lel quan es detecta només un dels dos fluorocroms, i heterozigotes quan es detecten els dos fluorocroms (Figura 22).



**Figura 21:** Representació esquemàtica del funcionament de l'emissió de fluorescència

Amb la presència del polimorfisme en qüestió (part esquerra de la figura), la sonda s'uneix a la cadena de DNA problema, i a mesura que la Taq polimerasa avança trenca dita sonda fent que el fluorocrom quedi lliure de la sonda, separant-se de l'inhibidor i emetent fluorescència [159].

### IV.3.1 Interpretació de resultats



**Figura 22:** Exemple del diagrama de genotipació proporcionat pel 7000 system software

En el cas de polimorfismes bi-al·lèlics es separa la població en tres grups, un per cada genotip. Cada al·lel s'assigna a un fluorocrom, definit per la casa comercial.

#### IV.3.2 Discriminació al·lèlica de HA-1

Per la genotipació del polimorfisme d'HA-1 mitjançant discriminació al·lèlica, es va obtenir l'assaig corresponent al SNP rs1801284 (Taula annex 4), i es van preparar les reaccions corresponents seguint les instruccions del fabricant (Taula annex 6), amb posteriors modificacions per a la seva optimització.

El fluorocrom VIC està assignat a l'al·lel HA-1H, el FAM a l'al·lel HA-1R.

Previ a la genotipació de les mostres "problema", es van analitzar 21 mostres de DNA procedents de 11 línies cel·lulars del *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain* (CEPH) de genotip conegut subministrades per *International Histocompatibility Workshop Group* (IHWG), les quals han estat utilitzades per a validació de la tècnica i com a posterior control per a cada experiment realitzat.

#### IV.3.3 Discriminació al·lèlica de HA-8

Seguint el mateix protocol, s'ha estudiat el polimorfisme de HA-8 rs2173904, tant per les mostres de DNA procedents del IHWG, com de les mostres de genotip desconegut.

Part de la seqüència complementària al polimorfisme es pot veure en la taula annex 4, i les condicions de la PCR a temps real a la taula annex 6.

En aquest cas, l'al·lel 1, associat al fluorocrom VIC correspon a la citosina. La presència d'aquest nucleòtid correspon a la traducció d'una prolina; mentre que l'al·lel 2, associat al fluorocrom FAM, correspon a una guanina, que donarà lloc a la traducció d'una arginina.

#### IV.3.4 Discriminació al·lèlica de UTA2-1

Pel polimorfisme nucleotídic rs2166807 (taula annex 4), la presència del pèptid immunogènic ve determinada per l'amplificació de l'al·lel 2 (FAM), i el no immunogènic per l'al·lel 1 (VIC); veure condicions d'amplificació a taula annex 6.

S'han genotipat per l'antigen menor UTA2-1 les 21 mostres procedents del IHWG i les mostres "problema". La principal diferència amb els AgsmH anteriors, és que al tractar-se d'un

polimorfisme descobert recentment, no hi ha referències genotípiques prèvies descrites. Per tal de validar la tècnica i obtenir controls pels posteriors experiments, s'han seqüenciat varies mostres de DNA comercial del CEPH escollides a l'atzar mitjançant electroforesi en capil·lar.

#### IV.4 SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA PER ELECTROFORESI EN CAPIL·LAR

La seqüenciació del DNA permet la determinació de l'ordre en què estan disposades les bases nitrogenades al llarg d'una seqüència nucleotídica d'una mostra de DNA. La tècnica es basa en l'ús de dideoxinucleòtids, que són nucleòtids (dNTPs) modificats que han perdut el grup hidroxil de la posició 3' de la desoxiribosa. Aquests nucleòtids poden incorporar-se a la cadena de DNA que s'està sintetitzant *de novo*, però no és possible que s'hi uneixi cap altre més nucleòtid per l'extrem 3', per tant, un cop incorporat un dideoxinucleòtid, finalitza la reacció de síntesi de la cadena de DNA (mètode Sanger).

Per dur a terme la seqüenciació en capil·lar, cal fer en primer lloc una reacció de PCR per tal d'amplificar la seqüència diana que es vol seqüenciar (Taula annex 7). Un cop comprovat el producte amplificat cal purificar el DNA de la resta de productes de reacció d'amplificació (Taula annex 7). Un segon pas previ a la seqüenciació, és fer el marcatge mitjançant els dideoxinucleòtids (cadascun associat a un fluorocrom diferent), això ho aconseguim a través d'una reacció d'amplificació, on el DNA problema és purificat prèviament, i afegint, a part dels components habituals d'una reacció de PCR (Taq DNA polimerasa, sals, tampó i dNTPs), els dNTPs modificats en el seu extrem 3' (*Bigdye Terminator 1.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems®*) i només un encebador, sentit o antisentit. En aquesta reacció es produeixen cadenes complementàries de DNA de longituds diferents (una per cada nucleòtid present en la seqüència diana) que seran sotmeses, un cop purificades i desnaturalitzades mitjançant formamida (*HDI Formamide, Applied Biosystems®*), a l'electroforesi capil·lar farcit de *POP-6™ Polymer (Applied Biosystems®)*. La mida de les noves cadenes, és directament proporcional a l'ordre de lectura. El software *310 GeneScan* ens dóna una seqüència en forma de pics que corresponen, cadascun d'ells, a una lectura de fluorescència emesa per cada cadena sintetitzada.

# V-GENOTIPAT DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4


Els polimorfismes de CTLA-4 objectiu d'aquest estudi han estat CT60 (rs3087243) i +49 (rs231775), els genotips dels quals han estat resolts mitjançant enzims de restricció (PCR-RFLPs) i discriminació al·lèlica.

## V.1 GENOTIPACIÓ MITJANÇANT PCR-RFLP

La PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*) és una variant de la PCR convencional, on un cop realitzada l'amplificació del fragment que flanqueja el polimorfisme d'interès es fa una incubació amb un enzim de restricció específic per una diana concreta, de manera que poden reconèixer la presència d'un al·lel i no de l'altre. El reconeixement de la seqüència diana té com a conseqüència la digestió d'aquesta, originant un tall en el punt concret, donant lloc a dos fragments; mentre que si no hi ha la seqüència diana, l'amplicó inicial no és fragmentat [160]. Així doncs, al resoldre els productes incubats amb l'enzim de restricció determinat en un gel d'agarosa, podem distingir els diferents al·lèls en funció de les mides i quantitats d'amplicons observats en cadascun dels carrils.

### V.1.1 PCR-RFLP de CT60

Un cop realitzada la PCR per a l'amplificació del fragment de 216 pb que conté l'SNP CT60 (veure Taula annex 4) es va fer una digestió (Taula annex 8) amb l'enzim de restricció NcoI (*New England Biolabs®INC*).

La presència de la diana [3'...GGTAC  C...5'], dona lloc a dos fragments, un de 196 pb, i un altre de 20 pb. Aquest segon no és visible en el gel d'agarosa [161, 162].



### V.1.2 PCR-RFLP de +49

Es va realitzar l'amplificació de la seqüència gènica de 674 pb que flanqueja el polimorfisme nucleotídic d'interès (Taula annex 4 i Taula annex 8) i se'n va fer la posterior digestió amb l'enzim de restricció Bbv I (*New England Biolabs®/INC*), la seqüència diana del qual és [5'...GCAGC(N<sub>8</sub>)▼...3']. La presència de l'al·lel diana origina dos amplicons, un de 115 pb i l'altre 559 pb, tots dos visibles en gel d'agarosa [162].

## V.2 DISCRIMINACIÓ AL·LÈLICA DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4

### V.2.1 Discriminació al·lèlica de CT60

Per la genotipació del polimorfisme CT60 mitjançant discriminació al·lèlica, es va obtenir l'assaig corresponent al SNP rs3087243 (Taula annex 4), i es van preparar les reaccions corresponents seguint les instruccions del fabricant, amb posteriors modificacions per a la seva optimització (Taula annex 6).

El fluorocrom VIC està assignat a l'al·lel A, el FAM a l'al·lel G.

Com a controls intern es van utilitzar mostres de genotip resolts prèviament amb PCR-RFLP.

### V.2.2 Discriminació al·lèlica de +49

De la mateixa manera es va genotipar el polimorfisme nucleotídic rs231775 (Taula annex 4). En aquest cas l'al·lel A, que resulta en la traducció d'una treonina estava assignat al fluorocrom VIC, mentre que l'al·lel G que es tradueix a una alanina, al FAM (veure condicions amplificació a la Taula annex 6).

# VI-ANÀLISI ESTADÍSTIC

## VI.1 FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES

Les freqüències al·lèliques i genotípiques observades de tots els polimorfismes objectes d'aquest estudi es van determinar per contacte directe, i van ser posteriorment comparades amb les freqüències esperades descrites a [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

Per a l'estimació de desequilibri de lligament entre parells d'al·lels i per determinar si la població es troba en equilibri de Hardy-Weinberg es va utilitzar el test de chi-quadrat.

## VI.2 HOMOGENEÏTAT ENTRE GRUPS

La homogeneïtat entre grups ha estat determinada pel test de chi-quadrat per les variables categòriques, mitjançant T-Student per a mostres independents per la comparació de dues mitjanes de variables quantitatives i el test ANOVA, per comparar la varianza entre més de dues variables contínues.

Un valor de p bilateral igual o inferior a 0.05 ha estat considerat com estadísticament significatiu.

## VI.3 ANÀLISI UNIVARIANT

Per a la determinació de la supervivència global (SG) i supervivència lliure de malaltia (SLM) hem utilitzat les corbes de *Kaplan-Meier* comparades amb test *log-rank*, que permet el contrast d'hipòtesis entre dues o més corbes de supervivència. Per l'anàlisi de malaltia d'empelt contra l'hoste aguda (graus II-IV i III-IV), mortalitat relacionada amb el transplantament (MRT) i la incidència de recidives hem utilitzat el test d'incidència acumulada considerant riscos competitius. La mort sense signes de malaltia d'empelt contra l'hoste va ser considerat un risc competitiu per a EICH aguda; i la mort en remissió complerta va ser considerada com a risc competitiu per a recidives.

Un valor de p bilateral igual o inferior a 0.05 ha estat considerat com estadísticament significatiu.

#### **VI.4 ANÀLISI MULTIVARIANT**

El model de regressió de Cox va ser utilitzat per a l'anàlisi multivariant. Totes les variables amb un p valor igual o inferior a 0.2 en l'anàlisi univariant van ser incloses en l'anàlisi multivariant.

Un valor de p bilateral igual o inferior a 0.05 ha estat considerat com estadísticament significatiu.

#### **VI.5 PODER ESTADÍSTIC**

Per tal de determinar la potència dels contrastos d'hipòtesis i el càlcul de la mida de la mostra, es va utilitzar la calculadora de grandària mostral: *Granmo versió 7.12*. Aquest programa va ser desenvolupat pel Consorci URLEC, pels grups de recerca en *Risc Cardiovascular i Nutrició* i en *Epidemiologia i Genètica cardiovascular* del Programa d'Investigació en processos inflamatoris i cardiovasculars de l'IMIM-Hospital del Mar.



# Resultats

---

*“...la ciència és un esforç de col·laboració. Els resultats combinats de diverses persones que treballen juntes és sovint, molt més eficaç del que podria ser el d'un científic que treballa sol”*

*John Bardeen*



# I- ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT

## I.1 VALIDACIÓ DE LA METODOLOGIA PROPOSADA PER SPIERINGS I COL-LABORADORS

*Spierings* i col·laboradors al 2006, van desenvolupar un únic protocol per a l'amplificació de 10 antígens menors d'histocompatibilitat, que inclouen HA-1, HA-2, HA-8 i HY, a partir de PCR d'encebadors específics de seqüència (SSP-PCR) [133].

S'han fet variacions del protocol per a la millora dels resultats; tenint en compte els diversos factors que poden afectar negativament a l'amplificació de la regió d'interès, descrits a l'apartat de material i mètodes (Taula annex 3).

## I.2 FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DELS AgsmH HA-1, HA-2, HA-8 , I UTA2-1 EN PARELLES DE DONANT I RECEPTOR

Es disposa d'un total de 1392 parelles de donants i receptors sotmeses a un al·lo-TPH a partir d'un donant HLA idèntic positives per la molècula de restricció HLA-A\*02:01. D'aquestes, s'ha realitzat la genotipació pels AgsmH: HA-1, HA-2, HA-8 i UTA2-1.

S'han estudiat les freqüències al·lèliques i genotípiques dels esmentats polimorfismes nucleotídics sense tenir en compte els criteris d'inclusió necessaris per a la seva posterior inclusió en l'estudi estadístic d'associació d'aquests en relació amb el resultat clínic post-al·lo-TPH. Les freqüències observades s'han comparat amb les freqüències descrites prèviament a [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) per a la població europea. La població per a tots els SNPs es troba en equilibri de Hardy-Weinberg. Els resultats es recullen a la Taula 5.

**Taula 5:** Freqüències al·lèliques i genotípiques observades *versus* esperades. Equilibri de H-W

AgmH / dbSNP	Freqüències al·lèliques observades		Freqüències genotípiques observades		$\chi^2$ Hardy-Weinberg (p 0.05)	Freqüències al·lèliques esperades		Freqüències genotípiques esperades	
HA-1 / rs1801284	H	0.37	HH	0.14	0.15	H	0.35	HH	0.15
	R	0.63	HR	0.46		R	0.65	HR	0.40
			RR	0.40				RR	0.45
HA-2 / rs61739531	V	0.68	VV	0.47	0.003	V	0.77	VV	0.60
	M	0.32	VM	0.43		M	0.23	VM	0.34
			MM	0.10				MM	0.06
HA-8 / rs2173904	R	0.45	RR	0.21	3.15	R	0.46	RR	0.21
	P	0.55	RP	0.47		P	0.54	RP	0.51
			PP	0.32				PP	0.28
UTA2-1 / rs2166807	L	0.23	LL	0.06	1.27	L	0.21	LL	0.03
	P	0.77	LP	0.34		P	0.79	LP	0.36
			PP	0.60				PP	0.61

La qualitat del DNA i factors adjacents a les tècniques utilitzades, han permès obtenir resultats de 1211 parelles per HA-1, 1098 per HA-2, 1179 per HA-8 i 1041 per UTA2-1.

Per HA-1 i UTA2-1, l'al·lel més expressat en la població és HA-1R i UTA2-1P, o no immunogènic, mentre que per HA-2 el més expressat és HA-2V, o al·lel immunogènic. D'altra banda HA-8, presenta una distribució molt similar per tots dos al·lells. La població es troba en equilibri de Hardy-Weinberg per a tots els antígens menors d'histocompatibilitat segons la taula de *Chi-quadrat* per un grau de llibertat (classes (3)-número d'al·lells (2)).

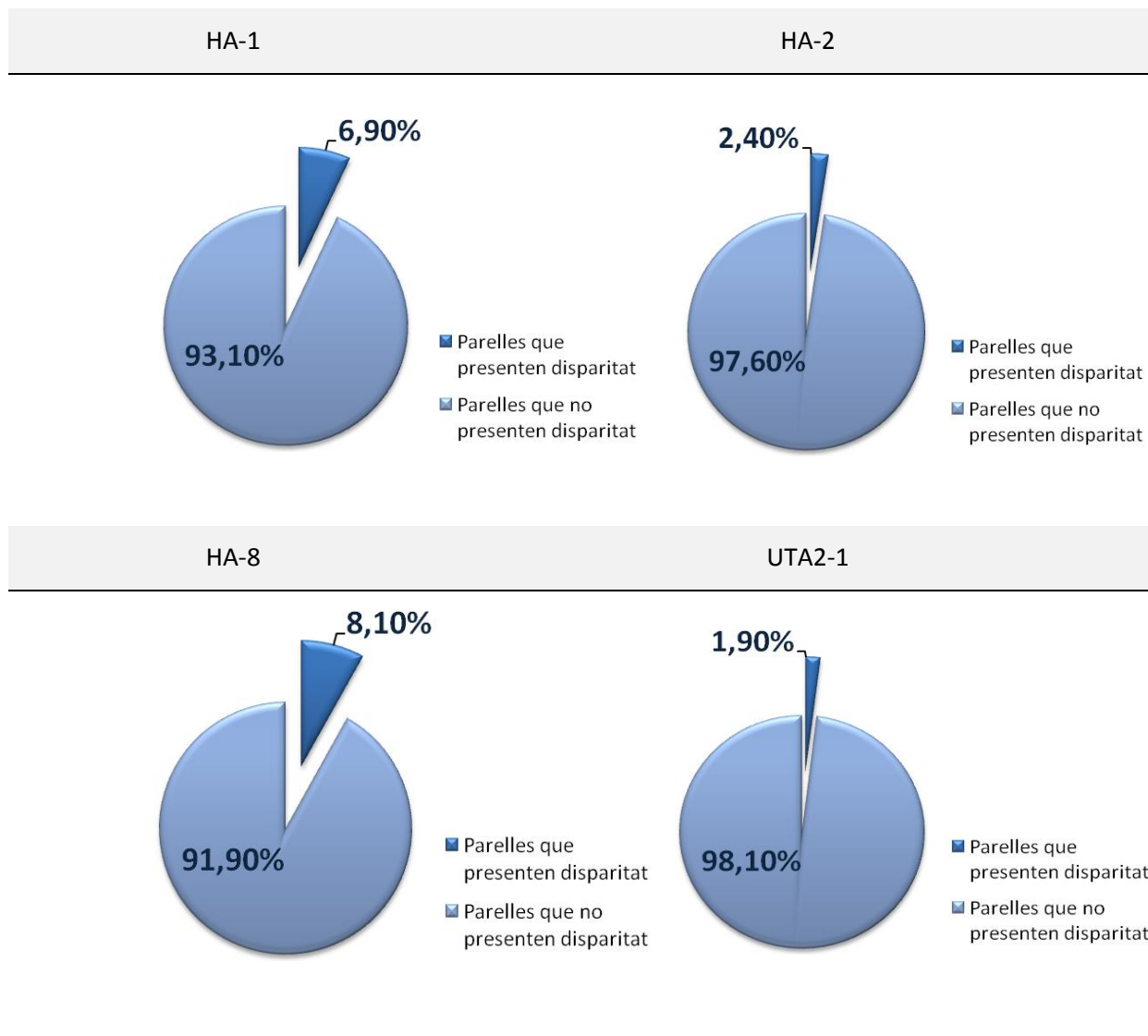
### I.3 FREQUÈNCIA DE LES DISPARITATS HA-1, HA-2, HA-8 I UTA2-1 ENTRE DONANTS I RECEPTORS

Com es ve dient al llarg del treball, la condició de disparitat ve definida per la presència de l'al·lel o pèptid immunogènic en el receptor, ja sigui en homozigosi o en heterozigosi, i la seva absència en el donant (Figura 18, Figura 19 i Figura20, apartat MATERIAL I MÈTODES). HA-1 i HA-8 presenten taxes de disparitat de 6.9% i 8.1% respectivament (Figura 23). En el cas de UTA2-1, l'al·lel no immunogènic és el més abundant en la població, fet que no es tradueix en un increment de disparitats entre donant i receptor; més aviat al contrari, on la freqüència de disparitat entre donant i receptor és del 1.9% de la població.



Per contra, si la freqüència de l'al·lel immunogènic és elevada, que ens trobem donant i receptor amb genotip diferent serà menys freqüent, i si a més a més cal que en el donant sigui absent, la condició de disparitat es restringeix en gran mesura, com és el cas de HA-2, amb un 2.4% de disparitats (Figura 23).

**Figura 23:** Representació gràfica de les freqüències de disparitat per a cada AgmH en el total de població estudiada



#### I.4 EFECTE DE LES DISPARITATS ENTRE DONANT I RECEPTOR DE CADASCUN DELS AgsmH EN QUANT A EVOLUCIÓ CLÍNICA DELS PACIENTS POST AL·LO-HSCT

Tal i com ja s'ha comentat, els AgsmH es poden classificar en dos grups. Mentre que alguns es limiten a cèl·lules de llinatge hematopoètic, altres són ubics sense estar restringits a cap tipus de teixit concret. La distribució dels antígens juga un paper important en el direccionament de les respostes al·logèniques cap a un efecte MECH o ECL; els antígens menors d'expressió ubica poden desencadenar reaccions que provoquen dany tissular amb la conseqüent MECH; mentre que aquells d'expressió restringida a teixit hematopoètic podran direccionar les reaccions al·logèniques cap a l'eradicació de la malaltia.

El motiu del present estudi és analitzar l'efecte de les disparitats entre donant i receptor d'HA-1, HA-2, HA-8, UTA2-1 i HY, en el resultat d'un al·lo-TPH a partir d'un donant HLA idèntic. L'estudi de la influència de dites disparitats ha donat lloc a la publicació d'un treball preliminar a la revista *Bone Marrow Transplant* en format de carta a l'editor, inclòs en l'annex II [137].

##### I.4.1 Homogeneïtat dels grups d'estudi

Les parelles incloses en l'anàlisi estadístic són les que compleixen les característiques descrites a la Taula 2 (Característiques de la població incloses en l'estudi dels AgsmH, apartat II.1 de MATERIAL I MÈTODES). S'ha dividit la població en dos grups per a cadascun dels AgsmH en funció de la presència o absència de disparitat entre donant i receptor.

Per tal de poder fer comparacions entre grups (disparitat *versus* no disparitat) es fa un estudi d'homogeneïtat per assegurar que no existeixen diferències estadísticament significatives entre grups i assegurar que són comparables. Les dades d'homogeneïtat de les poblacions es recullen a la Taula 6.

Les variables que s'han estudiat per descriure l'homogeneïtat de la població d'estudi són les següents: edat, fase de la malaltia, positivitat de citomegalovirus (CMV) tant en el pacient com en el donant, la disparitat de sexe, la font de progenitors hematopoètics, el tipus d'acondicionament rebut previ al transplantament, profilaxis de MECH i el diagnòstic.

**Taula 6:** Estudi d'homogeneïtat de la població pels diferents AgsmH

<b>Taula 6A:</b> Estudi d'homogeneïtat de la població per HA-1			
	Disparitat HA-1	No disparitat HA-1	p
Cohort	83 (6.9%)	1128 (93.1%)	
Edat	37.13	39.98	0.093
Sexe			
Home	47 (56.6%)	683 (60.5%)	
Dona	36 (43.4%)	445 (39.5%)	0.481
Fase de la malaltia			
Precoç	44 (59.5%)	597 (60.3%)	
Avançada	30 (40.5%)	393 (39.7%)	0.886
CMV pacient			
Pacient positiu per CMV	57 (82.6%)	726 (78.7%)	
Pacient negatiu per CMV	12 (17.4%)	197 (21.3%)	0.541
CMV donant			
Donant positiu per CMV	44 (72.1%)	658 (74.7%)	
Donant negatiu per CMV	17 (27.9%)	223 (25.3%)	0.650
Disparitat de sexe	20 (24.1%)	299 (26.6%)	0.624
Font de PH			
Sang perifèrica	52 (62.7%)	730 (64.8%)	
Moll d'os	31 (37.3%)	396 (35.2%)	0.688
Acondicionament			
Mieloablatiu	62 (75.6%)	767 (69.1%)	
RIC	20 (24.4%)	343 (30.9%)	0.216
Profilaxis			
No	0 (0%)	3 (0.3%)	
CSA	4 (5.0%)	60 (5.6%)	
CSA+MTX	68 (85.0%)	917 (85.3%)	
CSA+ corticoides	1 (1.3%)	25 (2.3%)	
Altres	7 (8.9%)	70 (6.5%)	0.940
Diagnòstic			
LLA	8 (9.6%)	177 (15.8%)	
LMA	24 (28.9%)	309 (27.6%)	
LMC	17 (20.5%)	187 (16.7%)	
AAS	1 (1.2%)	46 (4.1%)	
MM	9 (10.8%)	84 (7.5%)	
LNH	13 (15.7%)	148 (13.2%)	
Hodgkin	3 (3.6%)	40 (3.6%)	
SMD	6 (7.2%)	93 (8.3%)	
Altres	2 (2.4%)	37 (3.3%)	0.700

**Taula 6B:** Estudi d'homogeneïtat de la població per HA-2

	Disparitat HA-2	No disparitat HA-2	p
Cohort	26 (2.4%)	1072 (97.60%)	
Edat	43.8	40.1	0.219
Sexe			
Home	15 (57.7%)	643 (60.0%)	
Dona	11 (42.3%)	429 (40.0%)	0.841
Fase de la malaltia			
Precoç	14 (60.9%)	548 (58.6%)	
Avançada	9 (39.1%)	387 (41.4%)	1.000
CMV pacient			
Pacient positiu per CMV	19 (82.6%)	682 (79.1%)	
Pacient negatiu per CMV	4 (17.4%)	180 (20.9%)	0.800
CMV donant			
Donant positiu per CMV	14 (63.6%)	604 (74.0%)	
Donant negatiu per CMV	8 (36.4%)	212 (26.0%)	0.325
Disparitat de sexe	8 (30.8%)	269 (25.1%)	0.498
Font de PH			
Sang perifèrica	21 (80.8%)	724 (67.7%)	
Moll d'os	5 (19.2%)	346 (32.3%)	0.203
Acondicionament			
Mieloablatiu	16 (64.0%)	715 (67.8%)	
RIC	9 (36.0%)	339 (32.2%)	0.670
Profilaxis			
No	0 (0%)	3 (0.3%)	
CSA	1 (4.2%)	58 (5.7%)	
CSA+MTX	22 (91.6%)	868 (85.0%)	
CSA+ corticoides	0 (0.0%)	25 (2.4%)	
Altres	1 (4.2%)	67 (6.6%)	0.999
Diagnòstic			
LLA	2 (8.0%)	163 (15.3%)	
LMA	5 (20.0%)	294 (27.6%)	
LMC	5 (20.0%)	174 (16.3%)	
AAS	1 (4.0%)	42 (3.9%)	
MM	0 (0.0%)	85 (8.0%)	
LNH	3 (12.0%)	151 (14.2%)	
Hodgkin	2 (8.0%)	40 (3.7%)	
SMD	6 (24.0%)	84 (7.9%)	
Altres	1 (4.0%)	34 (3.2%)	0.171

**Taula 6C:** Estudi d'homogeneïtat de la població per HA-8

	Disparitat HA-8	No disparitat HA-8	p
Cohort	96 (8.1%)	1083 (91.9%)	
Edat	39.77	40.07	0.851
Sexe			
Home	64 (66.7%)	646 (59.6%)	
Dona	32 (33.3%)	437 (40.4%)	0.178
Fase de la malaltia			
Precoç	48 (57.0%)	564 (59.4%)	
Avançada	34 (43.0%)	386 (40.6%)	0.676
CMV pacient			
Pacient positiu per CMV	61 (81.3%)	697 (78.7%)	
Pacient negatiu per CMV	14 (18.7%)	189 (21.3%)	0.660
CMV donant			
Donant positiu per CMV	48 (69.6%)	630 (74.9%)	
Donant negatiu per CMV	21 (30.4%)	211 (25.1%)	0.327
Disparitat de sexe	31 (32.3%)	276 (25.5%)	0.148
Font de PH			
Sang perifèrica	65 (67.7%)	722 (66.8%)	
Moll d'os	31 (32.3%)	359 (33.2%)	0.855
Acondicionament			
Mieloablatiu	64 (68.8%)	726 (68.0%)	
RIC	29 (31.2%)	341 (32.0%)	0.878
Profilaxis			
No	1 (1.1%)	2 (0.2%)	
CSA	5 (5.7%)	53 (5.1%)	
CSA+MTX	72 (81.8%)	887 (85.7%)	
CSA+ corticoides	3 (3.4%)	23 (2.2%)	
Altres	7 (7.8%)	70 (6.9%)	0.674
Diagnòstic			
LLA	7 (7.3%)	173 (16.1%)	
LMA	27 (28.1%)	296 (27.5%)	
LMC	14 (14.6%)	177 (16.4%)	
AAS	6 (6.3%)	40 (3.7%)	
MM	7 (7.3%)	88 (8.2%)	
LNH	21 (21.9%)	140 (13.0%)	
Hodgkin	4 (4.2%)	38 (3.5%)	
SMD	5 (5.2%)	89 (8.3%)	
Altres	5 (5.2%)	35 (3.3%)	0.149

**Taula 6D:** Estudi d'homogeneïtat de la població per UTA2-1

	Disparitat UTA2-1	No disparitat UTA2-1	p
Cohort	20 (1.9%)	1021 (98.1%)	0.962
Edat	40.30	40.47	
Sexe			
Home	9 (45%)	611 (59.7%)	
Dona	11 (55%)	413 (40.3%)	0.250
Fase de la malaltia			
Precoç	11 (64.7%)	516 (57.9%)	
Avançada	6 (35.3%)	376 (42.1%)	0.629
CMV pacient			
Pacient positiu per CMV	13 (72.2%)	651 (78.7%)	
Pacient negatiu per CMV	5 (27.8%)	176 (21.3%)	0.560
CMV donant			
Donant positiu per CMV	11 (64.7%)	574 (73.8%)	
Donant negatiu per CMV	6 (35.3%)	204 (26.2%)	0.409
Disparitat de sexe	3 (15%)	258 (25.3%)	0.435
Font de PH			
Sang perifèrica	14 (70.0%)	710 (69.3%)	
Moll d'os	6 (30.0%)	313 (30.7%)	1.000
Acondicionament			
Mieloablatiu	13 (65.0%)	670 (66.6%)	
RIC	7 (35.0%)	336 (33.4%)	1.000
Profilaxis			
No	0 (0.0%)	3 (0.3%)	
CSA	0 (0.0%)	52 (5.6%)	
CSA+MTX	18 (90.0%)	828 (85.6%)	
CSA+ corticoides	0 (0.0%)	24 (2.4%)	
Altres	2 (10.0%)	65 (6.3%)	0.908
Diagnòstic			
LLA	0 (0.0%)	162 (15.9%)	
LMA	6 (30.0%)	285 (27.8%)	
LMC	5 (25.0%)	154 (15.1%)	
AAS	1 (5.0%)	38 (3.7%)	
MM	2 (10.0%)	80 (7.9%)	
LNH	3 (15.0%)	144 (14.2%)	
Hodgkin	0 (0.0%)	40 (3.9%)	
SMD	3 (15.0%)	83 (8.1%)	
Altres	0 (0.0%)	35 (3.5%)	0.606

S'ha considerat fase de la malaltia avançada després de la primera remissió completa en els pacients amb LA, després de la primera fase crònica en pacients amb LMC, i malaltia progressiva en pacients amb SMD, MM o limfoma. CMV fa referència a CMV, CSA, ciclosporina A; MTX, metotrexat. LLA indica leucèmia limfàtica aguda; LMA, leucèmia mieloide aguda; LMC, leucèmia mieloide crònica; AAS, anèmia aplàsica severa; MM, mieloma múltiple; LNH, limfoma no Hodgkin, SMD, síndrome mielodisplàstica.

Els estudis d'homogeneïtat mostren que les sèries són comparables entre elles.

#### **I.4.2 Anàlisi individual dels antígens menors d'histocompatibilitat**

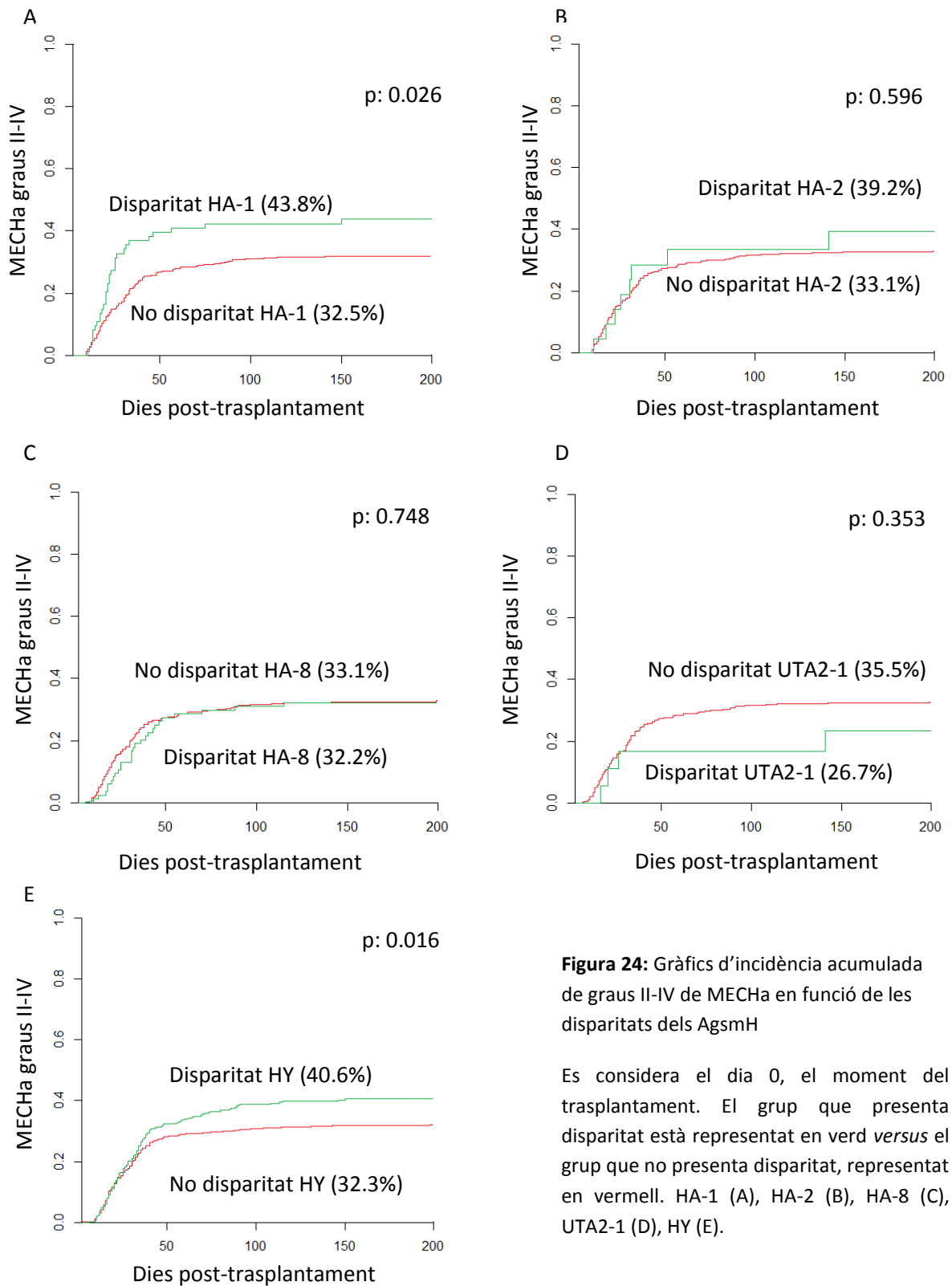
Com s'ha descrit prèviament a la Taula 1 (apartat III.1.2 Gradació clínica de la MECH, INTRODUCCIÓ) la MECH aguda es pot classificar en diferents graus depenent de la severitat d'aquesta. Es fa un primer anàlisi de la MECHa graus II-IV, i un segon anàlisi dels graus III-IV.

##### **I.4.2.1 Influència de les disparitats en AgsmH en MECH aguda graus II-IV**

La bibliografia descriu que les disparitats en l'antigen menor HA-1 s'associa a una major incidència de MECHa graus II-IV. Els resultats de l'anàlisi univariant concorden amb els reportats per altres grups, essent els que presenten una major incidència d'aquesta complicació aquelles parelles que difereixen en aquest antigen menor, 43.8%, davant de les parelles amb absència de disparitat, 32.5%, amb una significació de  $p: 0.026$  (Figura 24A).

La mateixa associació trobem quan analitzem la disparitat de sexe. La incidència acumulada de MECHa graus II-IV incrementa de 32.3% en les parelles que no presenten disparitat fins a un 40.6% en aquells pacients home, els donants dels quals són dones ( $p: 0.016$ ) (Figura 24E).

En canvi, no es detecten diferències estadísticament significatives en l'anàlisi univariant entre sèries quan considerem HA-2 (39.2% vs 33.1,  $p: 0.596$ ), HA-8 (32.2% vs 33.1%,  $p: 0.748$ ) o UTA2-1 (26.7% vs 35.5%,  $p: 0.353$ ) (Figura 24B, 24C, 24D).



**Figura 24:** Gràfics d'incidència acumulada de graus II-IV de MEChA en funció de les disparitats dels AgsmH

Es considera el dia 0, el moment del trasplantament. El grup que presenta disparitat està representat en verd *versus* el grup que no presenta disparitat, representat en vermell. HA-1 (A), HA-2 (B), HA-8 (C), UTA2-1 (D), HY (E).

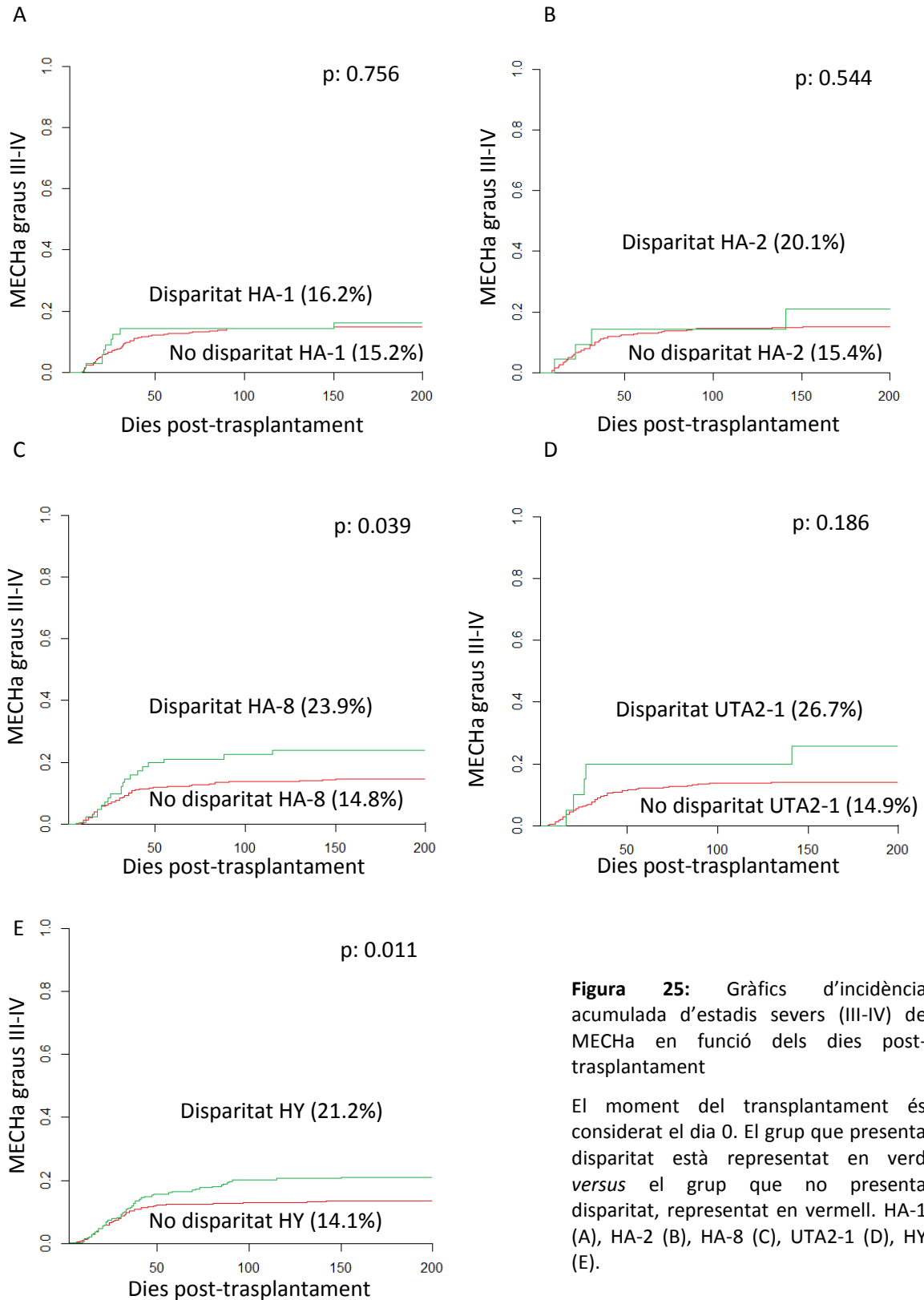


L'anàlisi multivariant per a la incidència de MECHa graus II-IV identifica tant la disparitat en HA-1 com la disparitat de sexe com a factors de risc independents pel desenvolupament de graus II-IV de MECHa. La probabilitat de desenvolupar dita complicació es veu incrementada en 1.35 vegades en presència de la disparitat de sexe (p: 0.012; hazard ratio (HR): 1.35; 95% d'interval de confiança (IC): 1.06-1.70), i incrementada en 1.57 vegades en presència de la disparitat HA-1 (p: 0.015; HR: 1.56; 95% (IC): 1.09-2.26) (Taula 7).

#### **1.4.2.2 Influència de les disparitats en AgsmH en MECH aguda graus III-IV**

No s'observen diferències entre grups amb o sense disparitat entre parelles donant-receptor quan considerem els antígens menors HA-1 (16.2% vs 15.2%, p: 0.756), HA-2 (20.1% vs 15.4%, p: 0.544) i tampoc UTA2-1 (26.7% vs 14.9%, p: 0.186) (Figura 25A, B i D).

L'anàlisi univariant detecta diferències estadísticament significatives quan s'estudia HA-8, essent el grup que presenta disparitat el que presenta una major incidència de MECHa III-IV (23.9% vs 14.8%, p: 0.039); així com quan s'avalua HY, on s'observa un increment d'aquesta complicació del 14.1% en el grup sense disparitat fins al 21.2% en el grup si que la presenta (p: 0.011) (Figura 25C i 25E).



**Figura 25:** Gràfics d'incidència acumulada d'estadis severos (III-IV) de MECHa en funció dels dies post-trasplantament

El moment del trasplantament és considerat el dia 0. El grup que presenta disparitat està representat en verd *versus* el grup que no presenta disparitat, representat en vermell. HA-1 (A), HA-2 (B), HA-8 (C), UTA2-1 (D), HY (E).

Es manté la significació estadística per la disparitat HY en l'anàlisi multivariant per a l'aparició de MECHa III-IV ( $p$ : 0.008, HR (95%IC): 1.690 (1.147-2.489)), juntament amb la profilaxis, el diagnòstic i la fase de la malaltia (Taula 7).

**Taula 7:** Anàlisi multivariant de MECH aguda

MECHa graus II-IV		
Variables	Significació estadística	Hazard Ratio (95%IC)
Disparitat HY	0.012	1.35 (1.07-1.71)
Disparitat HA-1	0.015	1.57 (1.09-2.26)
Profilaxis	0.176	1.27 (0.92-1.62)
Font de PH	0.057	1.24 (0.99-1.56)
MECHa graus III-IV		
Variables	Significació estadística	Hazard Ratio (95%IC)
Disparitat HY	0.008	1.69 (1.15-2.49)
Disparitat HA-8	0.315	1.35 (0.75-2.42)
Profilaxis	0.013	1.78 (1.13-2.80)
Font de PH	0.387	1.20 (0.80-1.80)
Fase de la malaltia	0.048	1.46 (1.00-2.13)
Diagnòstic	0.035	1.50 (1.03-2.20)

IC fa referència a Interval de confiança; PH a progenitors hematopoètics. La font de PH s'ha estratificat com sang perifèrica i moll d'os; la profilaxis com ciclosporina A/ metotrexat *versus* altres; i el diagnòstic com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres.

#### 1.4.2.3 Influència de les disparitats en AgsmH en MECH crònica

No es troben diferències estadísticament significatives entre els grups pels diferents antígens menors pel que fa a aquesta complicació, a excepció de quan s'analitza l'impacte de la disparitat de sexe on el grup amb disparitat presenta un 54.4% de pacients que desenvolupen aquesta complicació davant del 41.2% en el conjunt que no presenta disparitat de sexe en referència al seu donant ( $p < 0.001$ ) (Taula 8).

**Taula 8:** Resultats obtinguts per a MECH crònica en pacients que presenten disparitat en algun AgmH

AgmH	HA-1	HA-2	HA-8	UTA2-1	HY
Disparitat	44.1	55.6	38.7	52.9	54.5
No disparitat	45.3	45.5	45.8	45.5	41.2
$p$	0.845	0.476	0.237	0.626	<0.001

Al realitzar l'anàlisi estadístic per avaluar l'impacte dels diferents AgsmH en MECHc extensa, només HY presenta diferències estadísticament significatives entre grups (Taula 9).

**Taula 9:** Estudi de MECHc extensa en funció de la presència/ absència de disparitat en les diferents AgsmH

<b>AgmH</b>	<b>HA-1</b>	<b>HA-2</b>	<b>HA-8</b>	<b>UTA2-1</b>	<b>HY</b>
Disparitat	23.4%	6.7%	17.6%	31.3%	37.7%
No disparitat	25.8%	26.4%	26.5%	25.7%	20.3%
p	0.767	0.133	0.146	0.574	<0.001

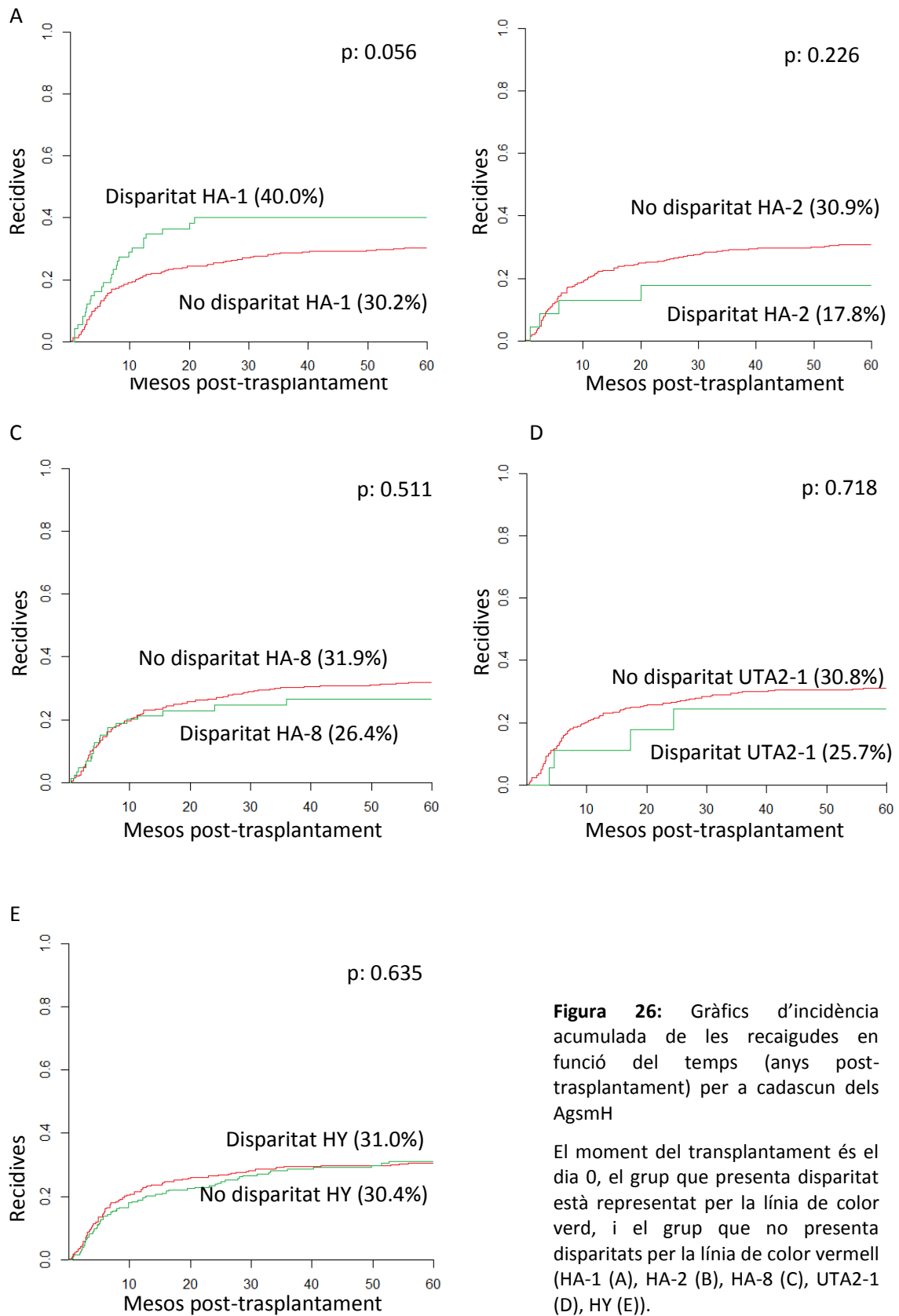
#### **I.4.2.4 Influència de les disparitats en AgsmH en altres variables clíniques**

##### **I.4.2.4.1 Recidives**

S'avalua la incidència de recidives davant la presència o l'absència de les disparitats entre donant i receptor post-trasplantament.

No s'observen diferències estadístiques entre conjunts en l'anàlisi univariant pels antígens menors HA-2 (17.8% vs 30.9%, p: 0.226), HA-8 (26.4% vs 31.9%, p: 0.511) o UTA2-1 (25.7% vs 30.8% p: 0.718) pel que fa a recaigudes. El comportament dels grups amb o sense disparitat HY és pràcticament igual independentment de la presència o absència de la disparitat (31.0% vs 30.4%, p: 0.635).

Per altra banda, s'observa una tendència a la significació si ens fixem en la taxa de recidives a l'analitzar HA-1, que ha estat del 40.0% pel grup que en el qual donant i receptor presenten disparitat, davant del 30.2% pel grup sense disparitats (p: 0.056); aquesta significació es perd al realitzar l'anàlisi multivariant (Taula 10).



**Figura 26:** Gràfics d'incidència acumulada de les recaigudes en funció del temps (anys post-trasplantament) per a cadascun dels AgsmH

El moment del trasplantament és el dia 0, el grup que presenta disparitat està representat per la línia de color verd, i el grup que no presenta disparitats per la línia de color vermell (HA-1 (A), HA-2 (B), HA-8 (C), UTA2-1 (D), HY (E)).

**Taula 10:** Anàlisi multivariant de recidives

<b>Variables</b>	<b>Significació estadística</b>	<b>HR (95%IC)</b>
Diagnòstic	0.010	1.40 (1.08-1.81)
Fase de la malaltia	<0.001	2.20 (1.71-2.83)
Font de PH	0.472	1.12 (0.83-1.52)
Acondicionament	0.215	1.21 (0.90-1.64)
TBI	0.439	1.13 (0.83-1.53)
Disparitat HA-1	0.151	1.38 (0.89-2.14)

IC fa referència a Interval de confiança; PH a progenitors hematopoètics; TBI de l'anglès "*total body irradiation*". El diagnòstic s'ha estratificat com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres, la fase de la malaltia com a precoç o avançada, la font de PH s'ha estratificat com sang perifèrica i moll d'os i TBI, com a pacients que han rebut quimioteràpia + TBI o només quimioteràpia.

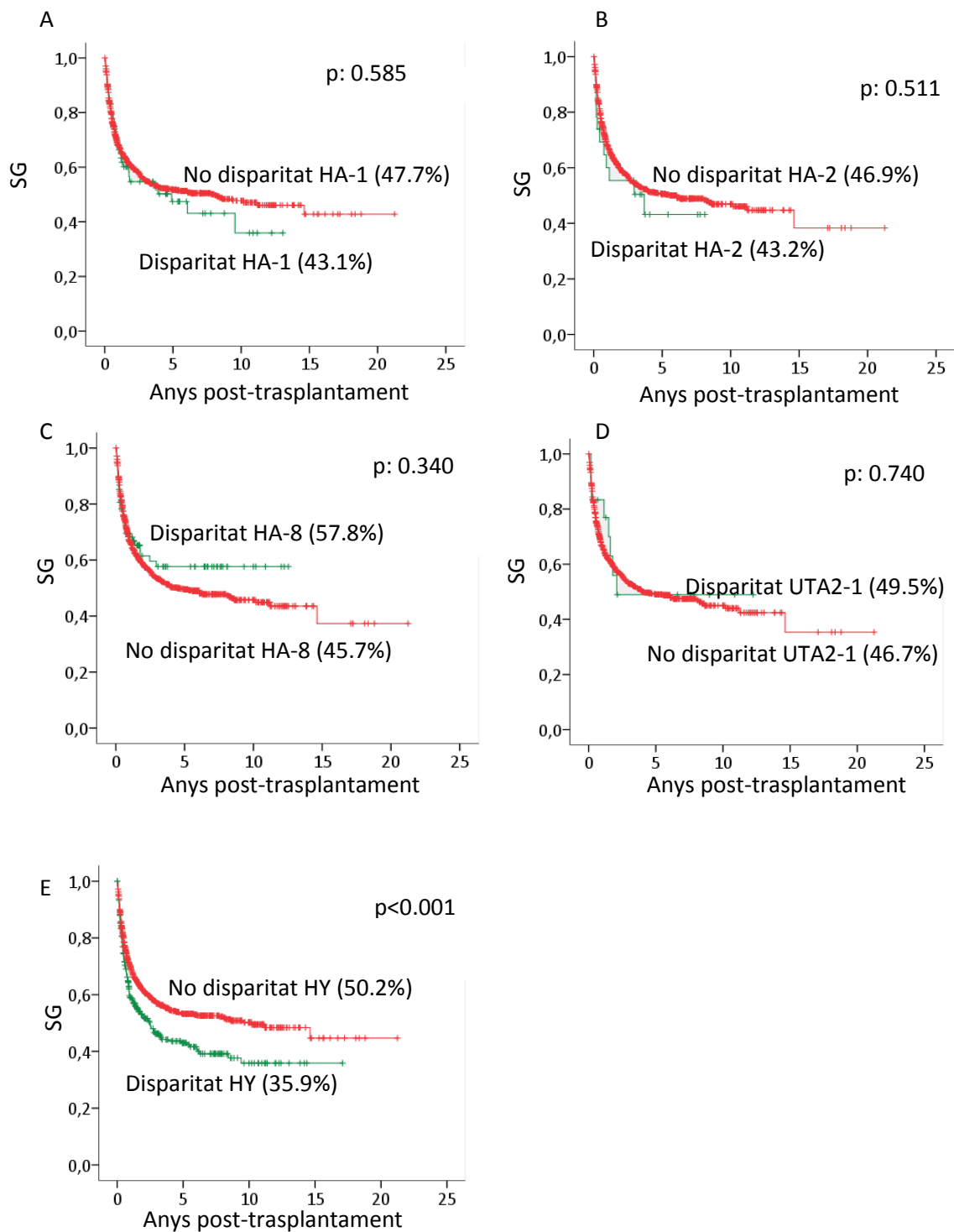
#### I.4.2.4.2 Supervivència global

La bibliografia descriu que algunes disparitats en AgsMh poden estar associades a una menor supervivència global. Per aquest motiu s'analitza aquesta variable en la població d'estudi.

La presència de disparitat entre donant i receptor en HA-1 no s'associa a una pitjor SG (4.31% vs 47.7%, p: 0.585). Els mateixos resultats trobem a l'analitzar l'impacte de HA-2 (43.2% vs 46.9%, p: 0.511). Tampoc s'observen diferències estadístiques en els resultats obtinguts a l'estudiar l'impacte de les disparitats HA-8 i UTA2-1 (57.8% vs 45.7%, p: 0.340 i 49.5% vs 46.7%, p: 0.741, respectivament) (Figura 27).

Si que trobem significació estadística amb un valor de  $p < 0.001$  quan analitzem la disparitat de sexe. En aquest cas, el grup en què els receptors són homes i les donants són dones, la taxa de supervivència a 10 anys és de 35.9%, que incrementa fins al 50.2% en el grup en què donant i receptor no presenten disparitat (Figura 27E).

Aquests resultats suggereixen, si bé les disparitats en HA-1 s'associen a una major incidència de MEChA II-IV i en HA-8 a una major incidència de MEChA III-IV, no impliquen una pitjor supervivència global.



**Figura 27:** Corbes de supervivència en funció de la presència o absència de la disparitat en els AgsmH

El moment 0, correspon al moment del trasplantament. El grup que presenta disparitat està representat en verd, el grup amb absència de disparitat, ve representat en vermell. (HA-1 (A), HA-2 (B), HA-8 (C), UTA2-1 (D), HY (E)).

Al realitzar l'anàlisi multivariant s'identifica la disparitat de sexe com a factor de risc per a la SG, on el grup que presenta aquesta disparitat té 1.325 vegades més probabilitats de presentar pitjor SG (Taula 11). A més de la disparitat HY s'identifiquen com a factors de risc per a una pitjor SG l'edat, el diagnòstic, la fase de la malaltia i la font de progenitors hematopoètics.

**Taula 11** : Anàlisi multivariant de SG

<b>Variables</b>	<b>Significació estadística</b>	<b>HR (95%IC)</b>
Edat	0.001	1.40 (1.16-1.70)
Diagnòstic	0.009	1.29 (1.07-1.56)
Fase de la malaltia	<0.001	2.31 (1.91-2.81)
Acondicionament al trasplantament	0.665	1.06 (0.82-1.36)
Profilaxis	0.254	1.15 (0.90-1.47)
Font de PH	0.017	1.29 (1.05-1.59)
Disparitat sexe	0.006	1.33 (1.08-1.62)

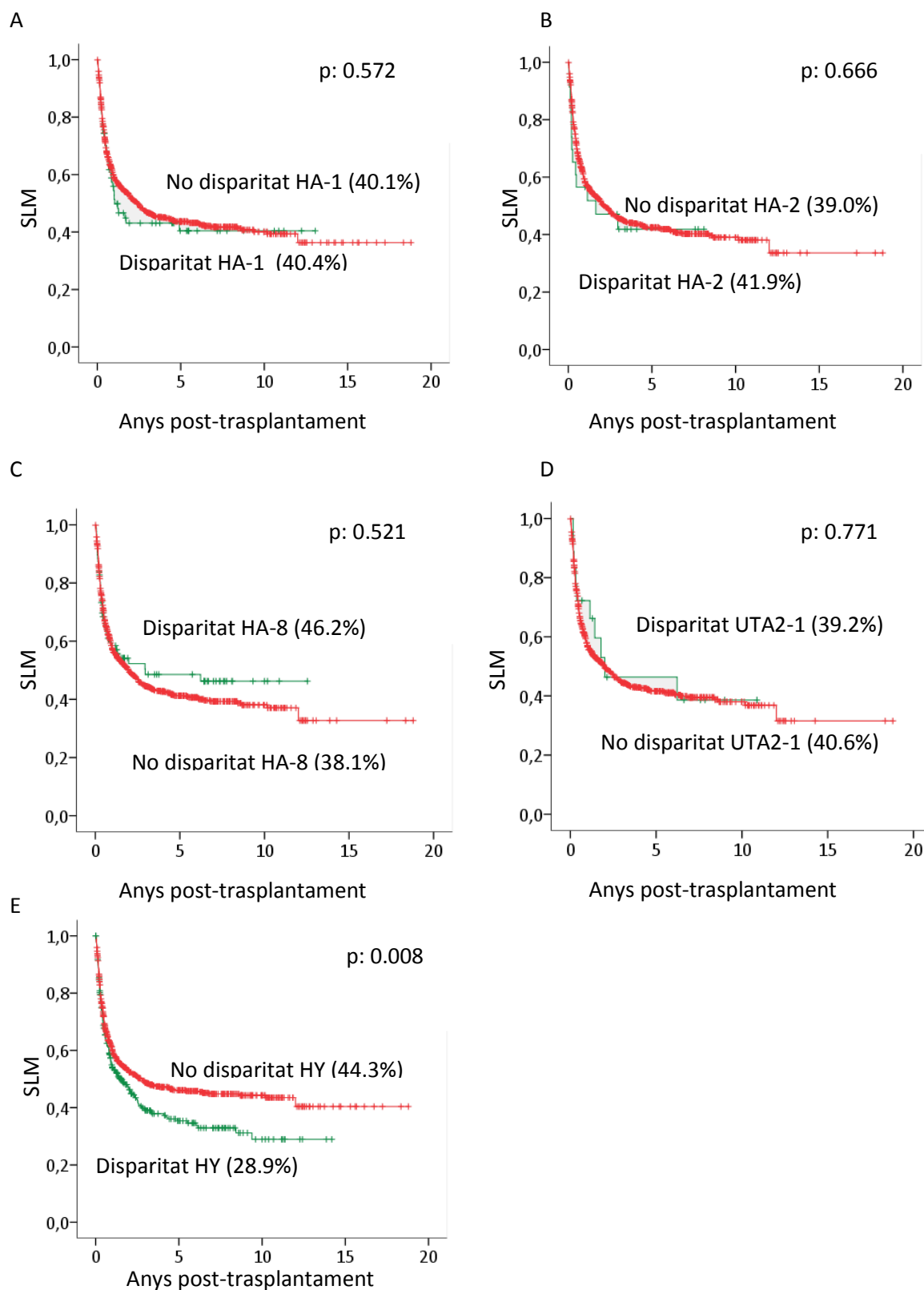
IC fa referència a Interval de confiança; PH a progenitors hematopoètics. L'edat s'ha estratificat en menors de 42 anys o majors de 42 anys, el diagnòstic s'ha estratificat com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres, la fase de la malaltia com a precoç o avançada, l'acondicionament, en mieloablatiu o d'intensitat reduïda, la profilaxis s'ha estratificat en CSA/MTX *versus* altres i la font de PH s'ha com sang perifèrica i moll d'os.

#### I.4.2.4.3 Supervivència lliure de malaltia

Segons els resultats obtinguts, podríem dir que la presència de disparitats entre donant i receptor en aquests AgsmH no té un impacte rellevant en la SLM a 10 anys a excepció de la disparitat de sexe, atès que les taxes observades són molt similars entre grups amb i sense disparitat. Els valors obtinguts a l'estudiar HA-1 són: 40.4% vs 40.1%, p: 0.572, tampoc es troben diferències estadístiques a l'analitzar HA-2 (41.9% vs 39.0%, p:0.666). La SLM observada al determinar l'impacte de la disparitat HA-8 és del 46.2% vs 38.1%, p: 0.521; la no significació estadística es manté a l'estudiar UTA2-1 (39.2% vs 40.6%, p: 0.771) (Figura 28A, 28B, 28C i 28D).

L'anàlisi univariant detecta diferències estadísticament significatives per HY (p: 0.008), on els pacients homes que han rebut un trasplantament a partir de donants dones, mostren una taxa de supervivència lliure de malaltia del 28.9%, incrementant en el grup en què donant i receptor no presenten disparitat de sexe fins al 44.3% (Figura 28E).





**Figura 28:** Gràfics que representen la supervivència lliure de malaltia en funció dels anys post trasplantament, per a les disparitats de cadascun dels AgsmH inclosos en l'estudi

(HA-1(A), HA-2(B), HA-8(C), UTA2-1(D), HY (E) La línia verda representa el grup que presenta disparitats, la vermella, al grup amb absència de disparitats. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

S'inclouen en l'anàlisi multivariant totes aquelles variables amb una significació estadística inferior a 0.2 en l'univariant. S'identifiquen com a factors de risc independent per SLM la disparitat de sexe, juntament amb la fase de la malaltia i l'edat (Taula 12).

**Taula 12:** Anàlisi multivariant per SLM

<b>Variables</b>	<b>Significació estadística</b>	<b>HR (95%IC)</b>
Edat	0.001	1.35 (1.13-1.61)
Diagnòstic	0.224	1.12 (0.94-1.33)
Fase de la malaltia	<0.001	2.21 (1.85-2.64)
Règim d'acondicionament	0.559	1.08 (0.84-1.37)
Font de PH	0.270	1.11 (0.92-1.35)
Disparitat sexe	0.031	1.23 (1.02-1.49)

HR: Hazard Ratio, IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics. L'edat s'ha estratificat en menors o majors de 42 anys, el diagnòstic s'ha estratificat com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres, la fase de la malaltia com a precoç o avançada, l'acondicionament, en mieloablatiu o d'intensitat reduïda i la font de PH s'ha com sang perifèrica i moll d'os.

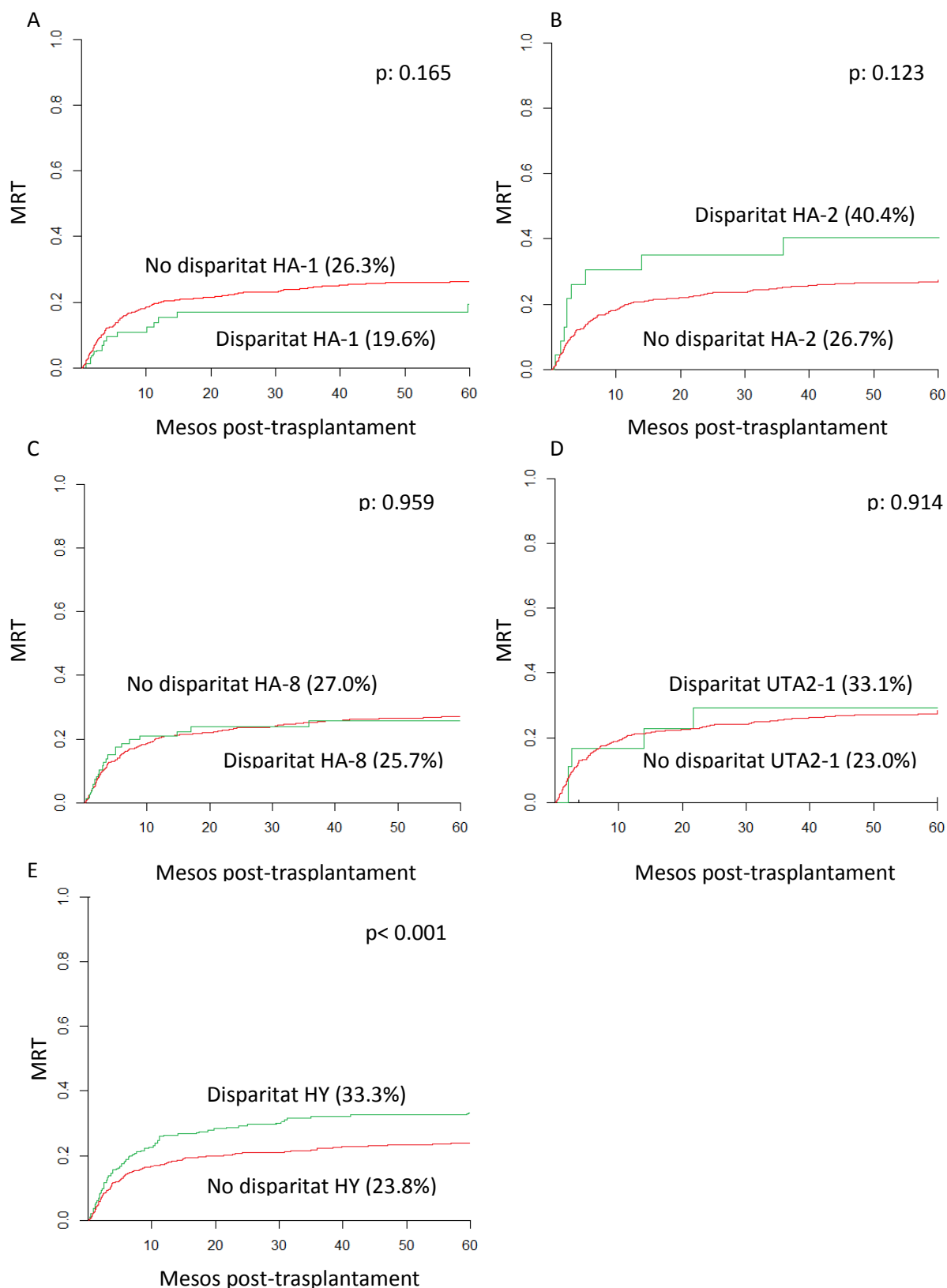
#### 1.4.2.4.4 Mort relacionada amb el trasplantament

En aquest apartat s'ha determinat l'impacte de les disparitats en els diferents AgsmH en la mort relacionada amb el trasplantament.

Ens trobem novament, que l'única disparitat que té un impacte estadístic a l'hora d'analitzar aquesta variable és HY. S'intueix una tendència a la significació a l'analitzar HA-1 i HA-2 (19.6% vs 26.3%, p: 0.165 i 40.4% vs 26.7%, p: 0.123, respectivament) (Figura 29A i 29B).

Els valors observats al determinar l'impacte de la disparitat d'HA-8 són molt semblants entre grups (25.7% vs 27.0%; p: 0.959) (Figura 29C). Una significació similar s'obté al realitzar l'anàlisi d'UTA2-1 (33.1% vs 23.0%, p: 0.914) (Figura 29D).

L'anàlisi univariant per HY mostra que la disparitat en aquest antigen menor té un impacte en la mort relacionada amb el trasplantament ( $p < 0.001$ ); el grup que presenta disparitat entre donant i receptor mostra una taxa de MRT del 33.3%, que disminueix fins al 23.8% en el conjunt amb absència de disparitat (Figura 29E). El multivariant confirma aquesta associació, i identifica també la font de PH i la fase de malaltia com a factors de risc per a la MRT (Taula 13).



**Figura 29:** Representació gràfica de la MRT post-al·lo-TPH per a cadascun dels AgsmH

HA-1(A), HA-2(B), HA-8(C), UTA2-1(D), HY(E). El temps 0 correspon al moment del trasplantament. La línia verda representa el grup que presenta disparitats, la vermella, al grup amb absència de disparitats.

**Taula 13:** Anàlisi multivariant per MRT

<b>Variables</b>	<b>Significació estadística</b>	<b>HR (95%IC)</b>
Diagnòstic	0.041	0.75 (0.58-0.99)
Fase de la malaltia	<0.001	1.79 (1.37-2.34)
Font de PH	0.005	1.57 (1.15-2.15)
Acondicionament	0.004	1.63 (1.17-2.29)
Disparitat de sexe	0.002	1.54 (1.18-2.01)
Edat	<0.001	2.03 (1.30-2.69)

HR: Hazard Ratio, IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics. El diagnòstic s'ha estratificat com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres, la fase de la malaltia com a precoç o avançada, la font de PH com sang perifèrica i moll d'os, l'acondicionament, en mieloablatiu o d'intensitat reduïda i l'edat s'ha estratificat en menors o majors de 42 anys.

#### **I.5 ANÀLISI DE L'EFECTE ACUMULATIU DE LES DISPARITATS ENTRE DONANT I RECEPTOR DELS AgsmH EN QUANT A EVOLUCIÓ CLÍNICA**

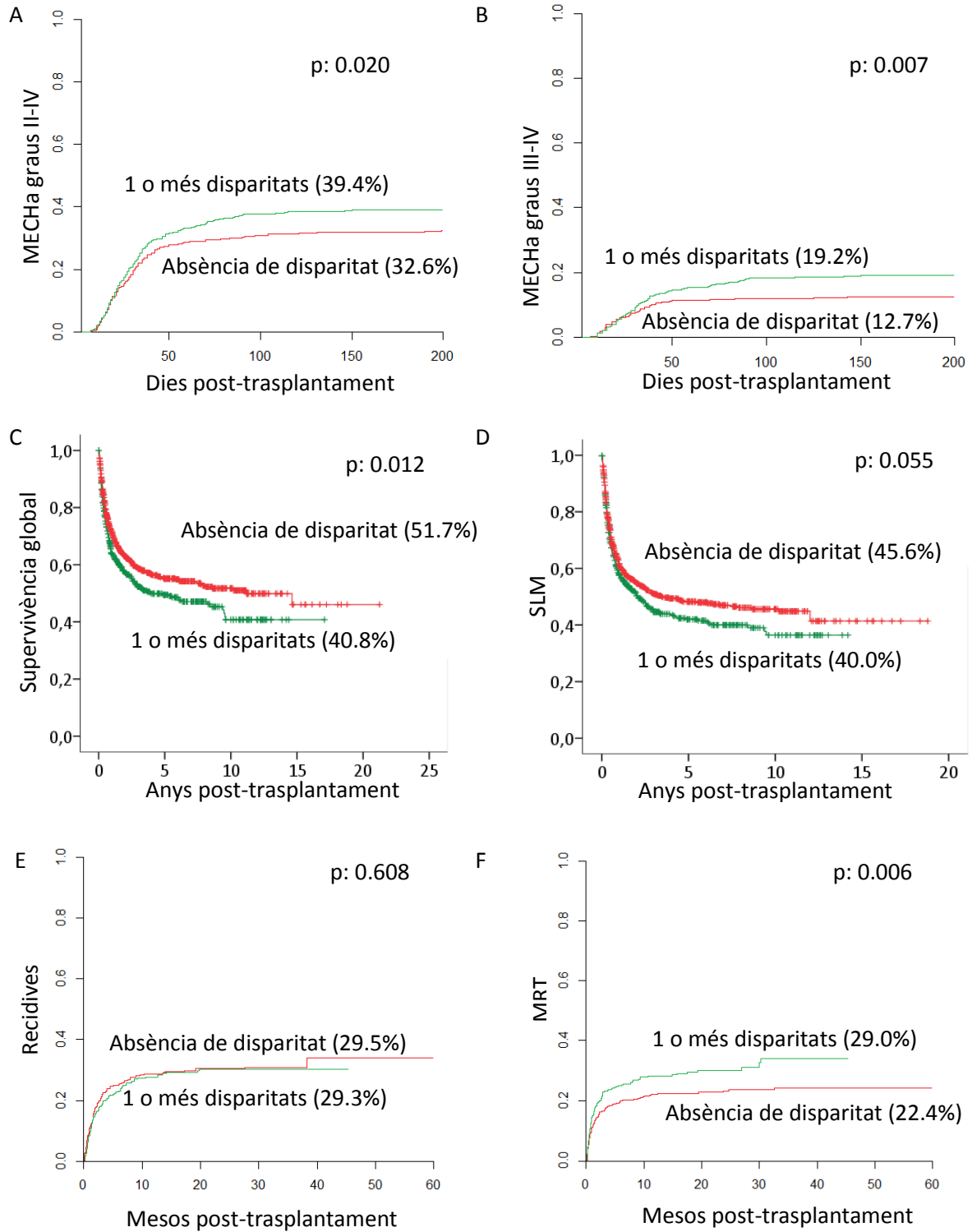
Actualment hi ha descrits 54 AgsmH en humans, tot i que sembla lògic creure que en queden pendents d'identificar atès que deriven de proteïnes polimòrfiques endògenes. Quan s'inicià aquest treball, només es coneixien 29 antígens menors, dels quals només 5 venen restringits per les molècules HLA-A\*02:01. Sembla plausible pensar que entre parelles de donant i receptor sotmeses a un al·lo-TPH, les diferències antigèniques no quedin restringides a un únic AgmH, que difereixin en més d'un i que el resultat clínic al trasplantament estigui associat a l'efecte acumulatiu de les disparitats totals entre individus.

En aquest apartat s'avalua, per una banda, si la presència d' almenys una disparitat en els antígens menors d'histocompatibilitat vehiculitzats per la molècula HLA-A\*02:01 són motiu d'un pitjor resultat clínic; i per altra banda, determinar si el nombre de disparitats entre donant i receptor tenen un efecte sumatori en quant a pronòstic.

### **I.5.1 Anàlisi de l'efecte d' almenys una disparitat en AgsmH en el resultat clínic post-al·lo-TPH**

Per a la realització d'aquest estudi, es van seleccionar un total de 1391 parelles de donant receptor, dels quals 863 (62%) no presenten cap disparitat en HA-1, HA-2, HA-8, UTA2-1 i HY; mentre que 528 parelles (38%) presenten almenys una disparitat en els antígens estudiats.

A l'analitzar la MECH aguda pels graus II-IV, observem diferències estadísticament significatives entre grups, essent el grup que presenta una o més disparitats el que té una major incidència de MECHa pels graus II-IV (39.4% vs 32.6%; p: 0.020) (Figura 30A). De la mateixa s'analitza la MECHa pels graus III-IV, i observem que el grup amb absència de disparitats presenta una menor incidència d'aquesta complicació de manera estadísticament significativa (19.2% vs 12.7%; p: 0.007) (Figura 30B). A l'estudiar la supervivència global s'obtenen diferències entre grups, essent el grup que presenta almenys una disparitat el que té pitjors resultats, amb taxes menors de supervivència global (40.8% vs 51.7%; p: 0.012) (Figura 30C). Pel que fa a SLM, s'observa una tendència a la significació (40.0% vs 45.6%; p: 0.055) (Figura 30D), motiu pel qual s'inclou en l'anàlisi multivariant. No trobem diferències estadísticament significatives entre grups a l'hora d'analitzar les recidives (29.3% vs 29.5%; p: 0.608) (Figura 30E). Finalment, el grup amb almenys una disparitat presenta una major taxa de mort relacionada amb el trasplantament de manera estadísticament significativa (29.0% vs 22.4%; p: 0.006) (Figura 30F).



**Figura 30:** Representació gràfica de les diferents variables estudiades en funció de l'absència de disparitat *versus* la presència d' almenys una disparitat

MECHa graus II-IV –A, MECHa graus III-IV – B, supervivència global – C, SLE (supervivència lliure de malaltia) –D, Recidives – E, MRT (mort relacionada amb el trasplantament) – F. En vermell es representa el grup amb absència de disparitat, en verd, el grup que presenta almenys una disparitat. El moment 0, representa el moment del trasplantament.

Al realitzar l'anàlisi multivariant per a cada una de les variables on s'han obtingut diferències estadísticament significatives (Figura 30), s'identifica en tots els casos, la presència d' almenys una disparitat entre donant i receptor a factor de risc pel desenvolupament de les variables descrites a la Taula 14.

**Taula 14:** Anàlisi multivariant per les diferents variables en l'estudi de l'efecte de la presència d' almenys una disparitat

Variable	Significació estadística	HR (95%IC)
<b>MECHa II-IV</b>		
Font de PH	0.015	1.30 (1.05-0.60)
Presència d'una o més disparitats	0.041	1.23 (1.01-1.50)
Profilaxis	0.457	1.10 (1.86-1.41)
<b>MECHa III-IV</b>		
Font de PH	0.047	1.44 (1.00-2.05)
Profilaxis	0.084	1.42 (0.96-2.10)
Fase de la malaltia	0.261	1.22 (0.86-1.72)
Diagnòstic	0.010	1.56 (1.11-2.18)
Presència d'una o més disparitats	0.042	1.41 (1.01-1.97)
<b>SG</b>		
Edat	0.001	1.40 (1.15-1.70)
Diagnòstic	0.011	1.28 (1.06-1.55)
Fase de la malaltia	<0.001	2.33 (1.92-2.83)
Font de PH	0.023	1.28 (1.03-1.58)
Profilaxis	0.173	1.18 (0.93-1.51)
Presència d'una o més disparitats	0.007	1.30 (1.07-1.57)
Acondicionament	0.819	1.03 (0.80-1.33)
<b>SLM</b>		
Edat	0.001	1.35 (1.13-1.61)
Diagnòstic	0.250	1.11 (0.93-1.33)
Fase de la malaltia	<0.001	2.22 (1.86-2.65)
Font de PH	0.302	1.11 (0.91-1.34)
Acondicionament	0.683	1.05 (1.02-1.46)
Presència d'una o més disparitats	0.036	1.21 (1.01-1.45)
<b>MRT</b>		
Edat	<0.001	2.01 (1.51-2.68)
Diagnòstic	0.041	1.33 (1.01-1.74)
Fase de la malaltia	<0.001	1.83 (1.40-2.39)
Font de PH	0.009	1.52 (1.11-2.08)
Acondicionament	0.010	1.57 (1.12-2.20)
Presència d'una o més disparitats	0.043	1.31 (1.01-1.70)

HR: Hazard Ratio, IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics. La font de PH s'ha estratificat com sang perifèrica i moll d'os, la profilaxis com pacients que han rebut CSA/MTX *versus* altres, el diagnòstic com a leucèmies agudes/síndrome mielodisplàstica *versus* altres, la fase de la malaltia com a precoç o avançada, l'acondicionament, en mieloablatiu o d'intensitat reduïda i l'edat s'ha estratificat en menors o majors de 42 anys.

Els resultats obtinguts a l'hora d'analitzar la presència d' almenys una disparitat entre grups *versus* absència, recorden als resultats obtinguts a l'hora d'analitzar la disparitat de sexe, suggerint que els valors obtinguts en aquest apartat es veuen afectats directament per la immunodominància dels antígens menors del cromosoma Y. Aquesta hipòtesi ha portat a realitzar el segon anàlisi d'aquest apartat, descrit a continuació.

### **I.5.2 Anàlisi de l'efecte acumulatiu de disparitats amb impacte directe en MECH aguda**

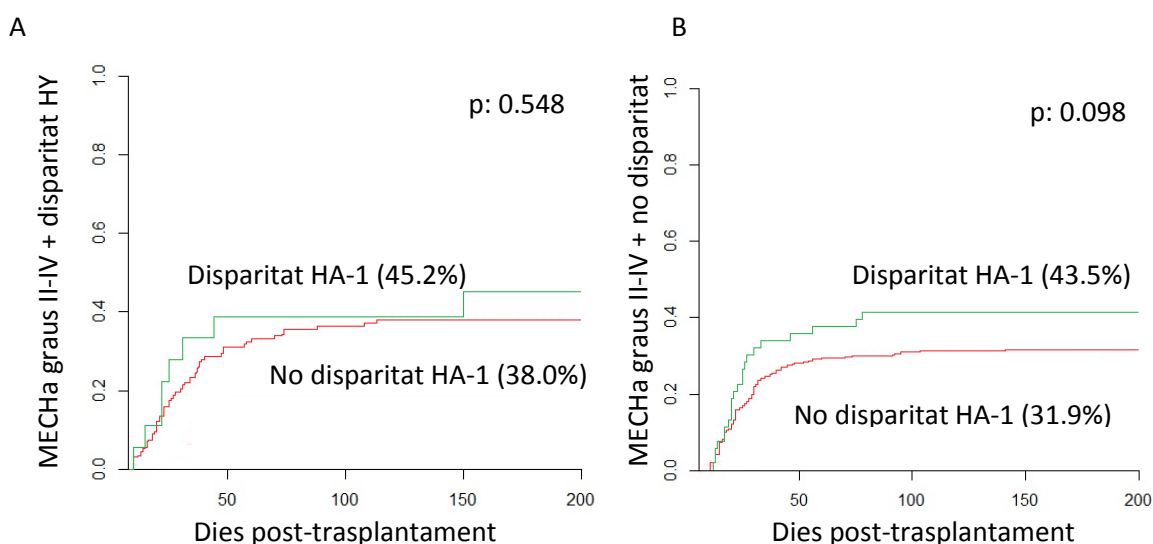
En aquest apartat s'avalua si el nombre de disparitats entre donant i receptor tenen un efecte sumatori negatiu en quant a pronòstic. Tenint en conte els resultats de l'anàlisi univariant de cadascun dels AgsmH, i la dominància immunogènica dels antígens menors codificats pel cromosoma Y, s'ha fet un nou anàlisi només per aquells pèptids en què la presència de disparitat entre donant i receptor ha estat significativa per MECHa, amb l'objectiu d'avaluar si aquestes disparitats tenen efecte sumatori en quant a l'aparició de les complicacions corresponents.

La presència de disparitat tant en HA-1 com en HY es tradueixen a una major incidència de malaltia d'empelt contra el receptor aguda pels graus II-IV; així com les disparitats en HA-8 i HY entre individus d'una mateixa parella, s'associen a una major taxa de MECHa graus III-IV.

Es fa una primera divisió de la cohort total en funció de la presència o absència de la disparitat de sexe entre individus d'una mateixa parella. De cada subpoblació, s'analitza la MECHa graus II-IV en presència o absència de disparitat HA-1 entre donant i pacient. Els resultats obtinguts no mostren diferències estadísticament significatives en presència o absència de disparitat en HA-1 en la subpoblació que presenta diferències per HY entre donant i receptor (45.2% vs 38.0%, p: 0.548) (Figura 31A), aquests resultats es poden explicar probablement, per la immunodominància de la disparitat HY. Si que s'observa una tendència a la significació estadística (p: 0.098) a l'analitzar la subpoblació amb absència de disparitat de sexe entre donant receptor, on el 43.5% dels pacients amb disparitat HA-1 desenvolupen MECHa graus II-IV davant del 31.9% que no presenten cap disparitat (Figura 31B). Al realitzar l'anàlisi multivariant s'identifica la disparitat HA-1 com a factor de risc independent per a un increment de risc de desenvolupament de MECHa II-IV en absència de disparitat HY (Taula 15).

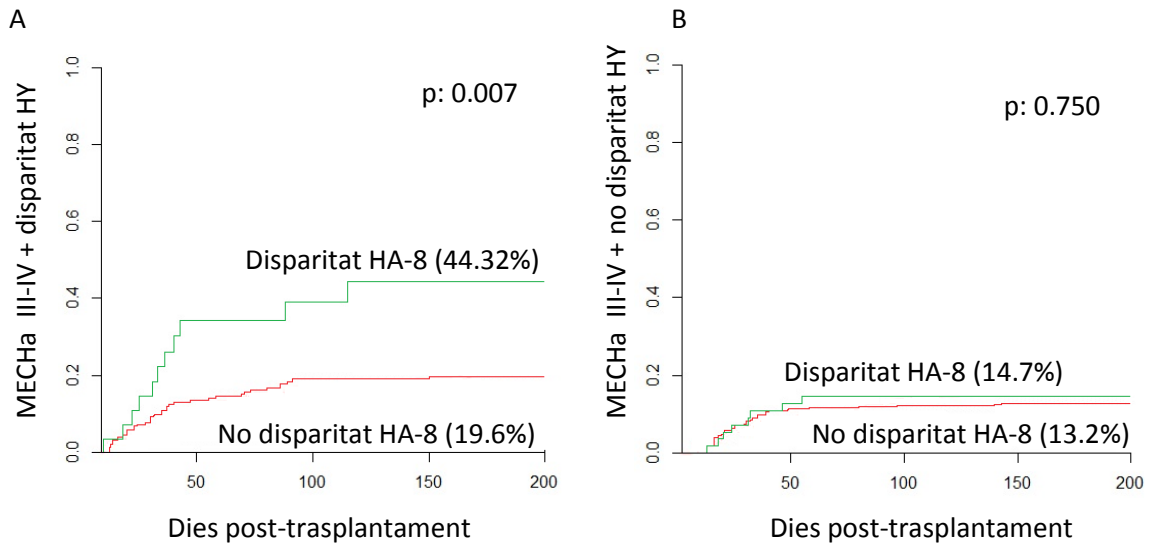


De la mateixa manera s’analiza l’impacte de les disparitats HA-8 i HY en MECHa graus III-IV. En la primera cohort (disparitat HY), l’anàlisi univariant detecta diferències estadístiques entre grups, essent el grup amb disparitat HY + disparitat HA-8 el que presenta una major taxa d’aquesta complicació (44.3% vs 19.6%,  $p: 0.007$ ). Aquesta significació es manté al realitzar l’anàlisi multivariant, en el què s’identifica la disparitat HA-8 com a factor de risc independent pel desenvolupament de MECHa III-IV en presència de disparitat HY (Taula 15). Per altra banda, en la segona cohort en què donant i receptor no presenten disparitat HY entre ells, es mostren unes taxes d’aparició de MECHa graus III-IV pràcticament iguals (14.7% vs 13.2%,  $p: 0.750$ ) (Figura 32). La disparitat HA-8 per si sola, no sembla ser rellevant en el desenvolupament de MECHa III-IV, per altra banda, sembla potenciar l’efecte de la disparitat de sexe.



**Figura 31:** Representació gràfica de l’efecte acumulatiu de HA-1 i HY en MECHa graus II-IV

A: Població amb disparitat HY entre donant i receptor. B: Població sense disparitat HY entre donant i pacient. En vermell es representa el grup que no presenta disparitat per HA-1, en verd, el grup que presenta disparitat.



**Figura 32:** Representació gràfica de l'efecte acumulatiu de HA-8 i HY en MECHa graus III-IV

A: Població amb disparitat HA-8 entre donant i receptor. B: Població sense disparitat HY entre donant i pacient. En vermell es representa el grup que no presenta disparitat per HA-8, en verd, els que sí la presenten.

**Taula 15:** Anàlisi multivariant per MECHa

Variable	Significació estadística	HR(95%IC)
MECHa II-IV en la subpoblació negativa per la disparitat HY		
Font de PH	0.116	1.25 (0.95-1.64)
TBI	0.031	1.36 (1.03-1.80)
Disparitat HA-1	0.024	1.63 (1.07-2.49)
MECHa III-IV en la subpoblació positiva per la disparitat HY		
Font de PH	0.663	1.15 (0.62-2.12)
TBI	0.266	1.54 (0.72-3.30)
Disparitat HA-8	0.020	2.30 (1.14-4.63)

HR: Hazard Ratio, IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics; TBI: de l'anglès "Total body irradiation". La font de PH s'ha estratificat com sang perifèrica i moll d'os, TBI, en pacients que han rebut quimioteràpia + radioteràpia *versus* pacients que han rebut quimioteràpia.

## II- MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA SEGONS EL GENOTIP CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES

Hi ha evidències que confirmen que el genotip de CTLA-4 està associat a un increment de malalties autoimmunitàries, i de que juga un paper en el context al·loimmunitari. No obstant, no existeixen estudis que determinin si aquests mateixos polimorfismes podrien estar modulant l'habilitat del sistema immunitari a l'hora d'iniciar una resposta immunitària en presència d'antígens específics.

### II.1 DETERMINACIÓ DE LES FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 EN ELS DONANTS

Es disposa d'un total de 1160 donants d'al·lo-TPH, dels quals s'han estudiat les freqüències al·lèliques i genotípiques del SNP CT60 de CTLA4 sense tenir en compte els criteris d'inclusió necessaris per a la seva posterior inclusió en l'estudi estadístic d'associació d'aquests en relació amb el resultat clínic post-al·lo-TPH. Les freqüències observades s'han comparat amb les freqüències descrites prèviament a [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) per a la població europea. Els resultats es recullen a Taula 16.

**Taula 16:** Freqüències al·lèliques i genotípiques observades *versus* esperades per CT60. Equilibri de H-W

Polimorfisme / dbSNP	Freqüències al·lèliques observades	Freqüències genotípiques observades	$\chi^2$ Hardy-Weinberg (p 0.05)	Freqüències al·lèliques esperades	Freqüències genotípiques esperades
CT60 / rs3087243	A 0.499 G 0.501	AA 0.256 AG 0.484 GG 0.259	1.244	A 0.470 G 0.530	AA 0.215 AG 0.511 GG 0.274

La població d'estudi es troba en equilibri de Hardy-Weinberg, amb un valor de *chi-quadrat* de 1.244 amb un p valor de 0.05, per un grau de llibertat (classes (3)-número d'al·lels (2)). Veiem que les freqüències de tots dos al·lels són molt similars, el que es tradueix en què el genotip més freqüent sigui el d'heterozigosi.

S'han estudiat les freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme en posició +49 de CTLA-4 d'un total de 1235 donants d'al·lo-TPH, sense tenir en compte els criteris d'inclusió necessaris per a la seva posterior implicació en l'estudi estadístic d'associació d'aquests en relació amb el resultat clínic post-al·lo-TPH. Els resultats obtinguts (Taula 17) mostren que l'al·lel més freqüent és l'al·lel A (0.693) davant de l'al·lel G (0.307), aquestes freqüències es tradueixen en un 49.1% d'homozigots per A, un 40.1% d'heterozigots i en un 10.8% d'homozigots per G en la nostra població d'estudi. Les nostres freqüències genotípiques varien lleugerament si les comparem amb les descrites prèviament a [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), tot i que la població es manté en equilibri de Hardy-Weinberg (3.05) per un grau de llibertat.

**Taula 17:** Freqüències al·lèliques i genotípiques observades *versus* esperades per +49. Equilibri de H-W

Polimorfisme / dbSNP	Freqüències al·lèliques observades	Freqüències genotípiques observades	X <sup>2</sup> Hardy-Weinberg (p 0.05)	Freqüències al·lèliques esperades	Freqüències genotípiques esperades
+49 / rs231775	A 0.693 G 0.307	AA 0.491 AG 0.401 GG 0.108	3.05	A 0.641 G 0.359	AA 0.400 AG 0.483 GG 0.117

## II.2 DETERMINACIÓ DE LA MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA DELS LIMFÒCITS T DEL DONANT SEGONS ELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES EN AGMH

Tal i com s'ha comentat prèviament, els canvis nucleotídics conseqüència dels SNP CT60 i posició +49, d'adenina per guanina, han estat estudiats en el context de malalties autoimmunitàries associant-se l'al·lel A com a protector, mentre que l'al·lel G, s'ha associat a un major risc pel desenvolupament o progressió d'esmentades malalties. En aquest apartat es pretén estudiar si el genotip d'aquests SNPs en el donant poden modular la resposta immunitària davant de les disparitats dels antígens menors estudiats prèviament.

La població d'estudi inclosa en l'anàlisi ha estat la mateixa que la utilitzada en l'estudi dels AghmH, la qual s'ha genotipat també pels polimorfismes de CTLA-4. Per causes adjacents a la tècnica utilitzada i la disponibilitat de DNA la cohort ha variat lleugerament (Taula 3- apartat II.2 IMMUNOMODULACIÓ DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES, II. POBLACIÓ D'ESTUDI, de MATERIALS I MÈTODES).

### I.2.1 Estudi d'homogeneïtat de la població

S'ha dividit la població d'estudi en tres grups, els pacients que han rebut un empelt sense deplecionar a partir d'un donant homozigot per l'al·lel associat com a protector (A) en malalties autoimmunitàries, els que han rebut l'empelt a partir d'un donant heterozigot, i el tercer grup, en què el genotip del donant conté dues Gs. S'ha fet un estudi d'homogeneïtat entre grups per tal d'avaluar si són o no comparables (veure Taula 18).

**Taula 18:** Estudi d'homogeneïtat de la població segons genotip CTLA-4

**Taula 18A:** SNP CT60

Genotip	CT60 AA	CT60 AG	CT60GG	p
Cohort	223 (25.9%)	414 (48.1%)	223 (25.9%)	
Edat	40.72 (4-68)	38.78 (0-69)	38.65 (1-68)	0.142
Sexe				
Home	132 (59.2%)	250 (60.4%)	130 (58.13%)	
Dona	91 (40.8%)	164 (39.6%)	93 (41.7%)	0.870
Diagnòstic				
Leucèmia aguda/ SMD	105 (48.6%)	202 (51.3%)	108 (49.8%)	
Altres	111 (51.4%)	193 (48.7%)	109 (50.2%)	0.813
Estat de la malaltia				
Precoç	116 (60.4%)	219 (61.2%)	111 (57.8%)	
Avançada	76 (39.6%)	139 (38.8%)	81 (42.2%)	0.741
Disparitat de sexe	62 (27.8%)	101 (24.5%)	62 (27.9%)	0.525
Règim d'acondicionament amb TBI	55 (25.8%)	106 (26.4%)	60 (27.4%)	0.932
Profilaxis				
CSA	9 (4.3%)	28 (7.2%)	12 (5.5%)	
CSA + MTX	181 (85.5%)	323 (82.6%)	188 (86.6%)	
CSA + corticosteroides	4 (1.9%)	12 (3.1%)	5 (2.3%)	
Altres	17 (8.3%)	28 (7.1%)	12 (5.6%)	0.733
CMVd	133 (80.6%)	233 (74.4%)	123 (71.5%)	0.139
CMVp	143 (81.3%)	252 (77.1%)	137 (76.5%)	0.479

**Taula 18B: SNP +49**

Genotip	+49 AA	+49AG	+49GG	p
Cohort	529 (49.1%)	432 (40.1%)	116 (10.8)	
Edat	41.56 (0-72)	38.17 (1-68)	38.94 (4-69)	0.002
Sexe				
Home	332 (62.8%)	262 (60.2%)	64 (55.2%)	
Dona	197 (37.2%)	170 (39.4%)	52 (44.8%)	0.306
Diagnòstic				
Leucèmia aguda/ SMD	261 (51.5%)	205 (49.5%)	58 (52.3%)	
Altres	246 (48.5%)	209 (50.5%)	53 (47.7%)	0.795
Estat de la malaltia				
Precoç	284 (61.7%)	213 (56.3%)	62 (58.5%)	
Avançada	176 (38.3%)	165 (43.7%)	44 (41.5%)	0.283
Disparitat de sexe	143 (27.0%)	120 (27.9%)	26 (22.4%)	0.493
Règim d'acondicionament amb TBI	134 (26.2%)	107 (25.4%)	44 (38.3%)	0.017
Profilaxis				
CSA	25 (5.1%)	26 (6.5%)	5 (4.6%)	
CSA + MTX	391 (79.8%)	330 (82.3%)	90 (83.3%)	
CSA + corticosteroides	10 (2.0%)	15 (3.7%)	1 (0.9%)	
Altres	64 (13.1%)	30 (7.5%)	12 (10.7%)	0.143
CMVd	353 (80.0%)	273 (76.9%)	72 (77.4%)	0.542
CMVp	302 (74.0%)	246 (75.0%)	64 (76.2%)	0.889

SMD indica Síndrome mielodisplàstica; TBI, de l'anglès "*total body irradiation*"; CSA: Ciclosporina A; MTX: metotrexat; CMV: citomegalovirus positiu. Disparitat de sexe: ha estat considerada quan el donant és una dona i el receptor un home.

L'estudi d'homogeneïtat mostra que les sèries són comparables entre elles, amb l'excepció que els pacients amb genotip homozigot per A en l'SNP en posició +49 tenen una mitjana d'edat més elevada, i el règim d'acondicionament amb TBI és més elevat en pacients que tenen un donant amb genotip GG.

## II.2.2 Impacte de la modulació de la resposta al·logènica davant les disparitats en els AgsmH mediada pels polimorfismes CTLA-4 del donant en MECH

L'objectiu principal del següent estudi és avaluar si el genotip CTLA-4 del donant modula la resposta immunitària davant de disparitats conegudes en els AgsmH estudiats prèviament, per aquest motiu, els diferents anàlisis només s'han fet sobre aquelles disparitats en què l'anàlisi

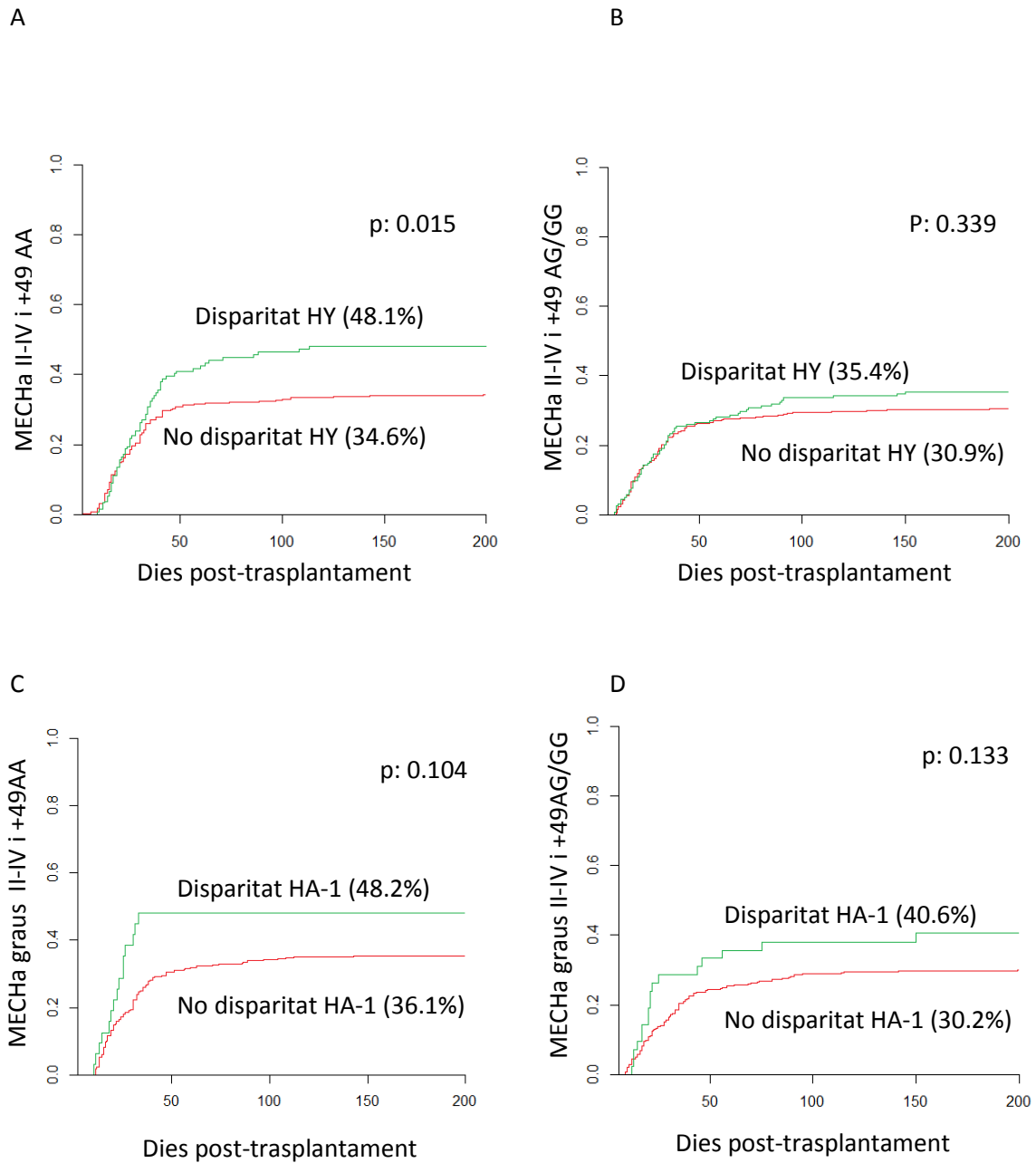
multivariant estadístic de l'apartat de RESULTATS I. ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT ha trobat significació estadística.

### II.2.2.1 Impacte en MECH aguda

L'anàlisi multivariant detecta la disparitat HA-1 i HY com a factors de risc pel desenvolupament de MECHa graus II, III o IV. La disparitat HY també s'associa a un increment de risc pel desenvolupament de MECHa graus III-IV, mentre que a l'analitzar HA-8, només s'observa una tendència a la significació (veure apartat de Resultats: I.4.2 Anàlisi individual dels antígens menors d'histocompatibilitat, I. ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT).

Si s'analitza la població en funció del genotip del polimorfisme en posició +49 de CTLA-4 s'observen els següents resultats: en l'anàlisi univariant, els pacients trasplantats a partir d'un donant homozigot per AA presenten un risc més elevat de desenvolupar MECHa graus II, III o IV en presència de la disparitat HY (48.1% vs 34.6%, p: 0.015) (Figura 33A), i s'observa una tendència a la significació a l'estudiar la disparitat HA-1 (48.2% vs 36.1%, p: 0.104C) (Figura 33). L'anàlisi multivariant identifica la presència tant de la disparitat HY com de la disparitat HA-1 com a factors de risc per a un major desenvolupament d'aquesta complicació (Taula 19). Per altra banda, no s'observa un increment de MECHa II, III o IV en presència de la disparitat HY (35.4% vs 30.9%, p: 0.339) o de la disparitat HA-1 (40.6% vs 30.2%, p: 0.133) quan els pacients són trasplantats a partir d'un donant amb genotip +49AG/GG (Figura 33B i Figura D, respectivament). L'anàlisi multivariant descarta la disparitat HA-1 com a factor de risc per a un increment de risc de desenvolupament d'aquesta complicació (Taula 19).

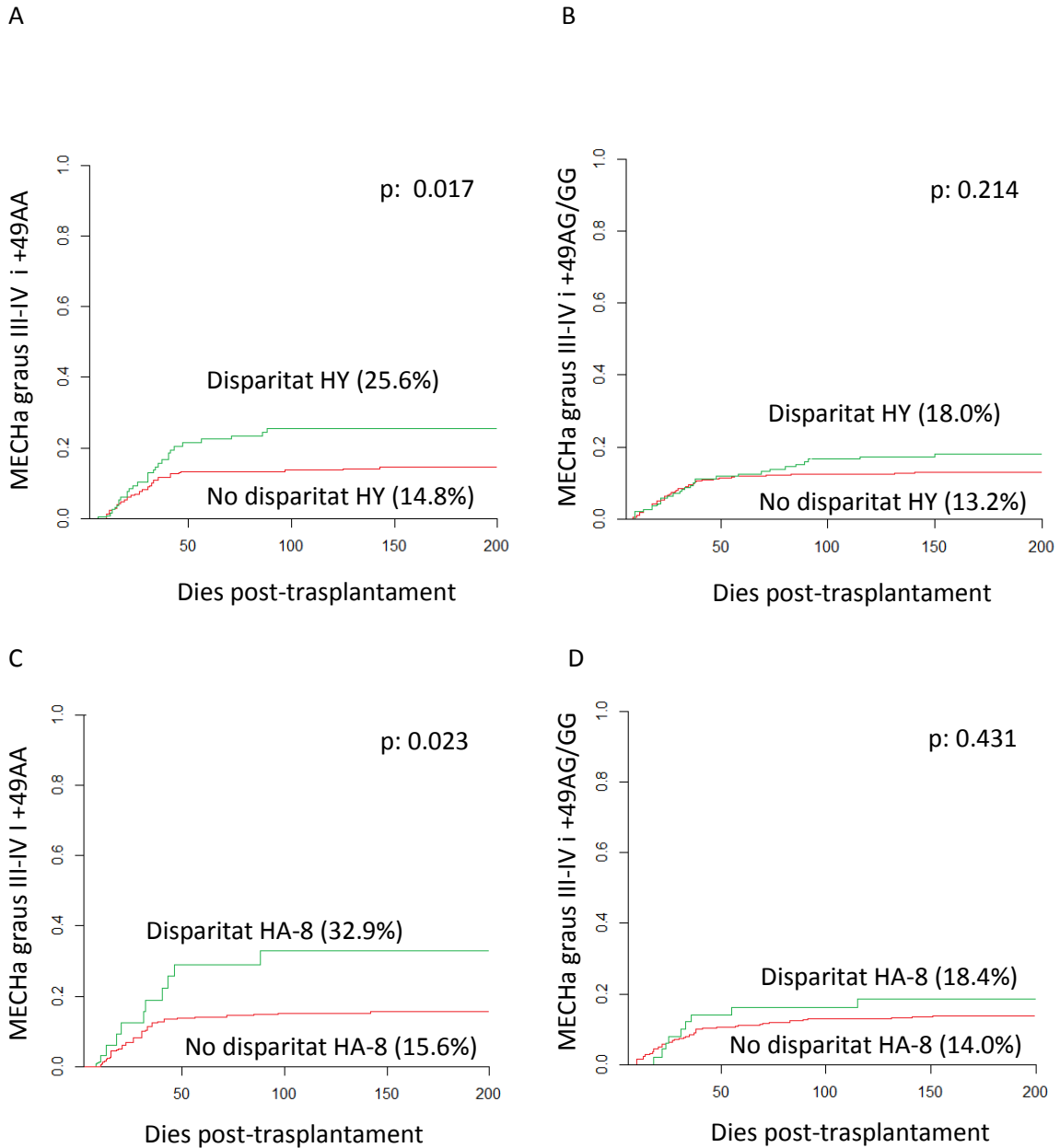
El risc de desenvolupar MECHa graus III-IV és més elevat en presència de la disparitat HY o de la disparitat HA-8, quan els pacients són trasplantats a partir d'un donant amb genotip del polimorfisme en posició +49 de CTLA-4 homozigot per A (25.6% vs 14.8%, p: 0.017; 32.9% vs 15.6%, p: 0.023, respectivament) (Figura 34A i Figura 34C). Aquesta associació queda confirmada amb l'anàlisi multivariant (Taula 19). No obstant, a l'analitzar els pacients amb donant heterozigots o homozigots per G de l'SNP +49 de CTLA-4, no s'observen diferències estadísticament significatives entre grups quan s'analitza la disparitat HY o HA-8 (HY: 18.0% vs 13.2%, p: 0.214; HA-8: 18.4% vs 14.0%, p: 0.431) (Figura 34B i Figura 34D).



**Figura 33:** Representació gràfica de l'impacte del genotip +49 de CTLA-4 en MECHa graus II-IV

A: Impacte de la disparitat HY en població amb genotip +49AA. B: Impacte de la disparitat HY en població amb genotip +49AG/GG. C: Impacte de la disparitat HA-1 en població +49AA. D: Impacte de la disparitat HA-1 en població +49AG/GG. En vermell es representen aquells pacients amb absència de disparitat, en verd, els pacients amb disparitat respecte als seus donants. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.





**Figura 34:** Representació gràfica MECHa graus III-IV

A: Impacte de la disparitat HY en subpoblació amb genotip +49AA; B: Impacte de la disparitat HY en la subpoblació amb genotip +49AG/GG; C: Representació de l'impacte de HA-8 en la subpoblació de genotips +49AA; D: Impacte de la disparitat HA-8 en la subpoblació amb genotip +49AG/GG. El grup que presenta disparitat entre donant i receptor està representades en verd, i el conjunt que no presenta disparitat entre individus de la parella, en vermell. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

**Taula 19:** Anàlisi multivariant MEChA en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4

Variable/ Subpoblació	Significació estadística	HR (95%IC)
<b>MEChA II-IV/ +49AA</b>		
Disparitat HA-1	0.005	2.18 (1.27-3.75)
Disparitat HY	0.025	1.50 (1.05-2.15)
Font de PH	0.169	1.28 (0.90-1.82)
Profilaxis	0.306	1.24 (0.82-1.87)
Diagnòstic	0.773	1.05 (0.75-1.47)
<b>MEChA II-IV/ +49AG/GG</b>		
Disparitat HA-1	0.233	1.44 (0.79-2.61)
Disparitat HY	0.847	0.96 (0.64-1.44)
Font de PH	0.237	1.25 (0.86-1.80)
Profilaxis	0.587	1.14 (0.71-1.82)
Diagnòstic	0.229	0.81 (0.57-1.14)
<b>MEChA III-IV/ +49AA</b>		
Disparitat HA-8	0.033	2.11 (1.06-4.18)
Disparitat HY	0.013	1.96 (1.15-3.32)
Font de PH	0.018	2.12 (1.14-3.95)
Profilaxis	0.570	1.21 (0.63-2.32)
Diagnòstic	0.140	0.67 (0.39-1.14)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics. La font de PH s'estratifica com a SP i MO; la profilaxis com a CSA o CSA+MTX *versus* altres; el règim d'acondicionament com a quimioteràpia + TBI i quimioteràpia; el diagnòstic s'estratifica com a LA o SMD *versus* altres i la fase de la malaltia, com a precoç i avançada.

### II.2.2.2 Impacte en MECh crònica

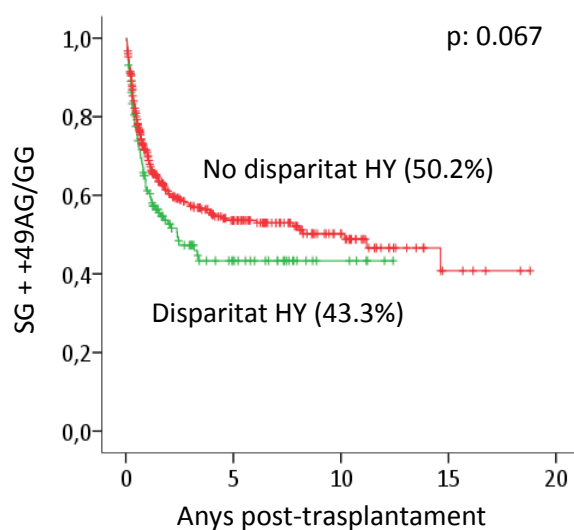
L'anàlisi univariant per determinar l'impacte de HY en MEChc mostra que hi ha diferències estadísticament significatives entre grups (48.6% vs 58.3%, p: 0.040) en els pacients amb donants amb genotip +49 AA.

La forma MEChc extensa s'ha estudiat per cada un dels genotips possibles del polimorfisme nucleotídic en posició +49 de la molècula CTLA-4 (anàlisi univariant de MEChc extensa en funció de la presència o absència de disparitat HY: 38.1% vs 20.6%, p< 0.001). Aquesta associació es manté quan es consideren els pacients amb genotip +49 homozigot per A (34.5% vs 21.7%, p: 0.008) o heterozigots (42.9% vs 18%, p<0.001), però es perd quan s'analitza MEChc extensa en el grup amb donants homozigots per G (25% vs 21.5%, p: 0.764).

### II.2.3 Impacte de la modulació de la resposta al·logènica davant les disparitats en els AgsmH mediada pels polimorfismes CTLA-4 del donant en altres variables clíniques

Quan no es té en compte el genotip de +49 de CTLA-4, no es detecten diferències estadístiques entre grups per a cap dels AgsmH estudiats en l'anàlisi univariant en relació a les recidives, en canvi, la supervivència global es veu disminuïda per la presència de la disparitat HY entre donant i receptor en l'anàlisi multivariant, així com la SLM. L'impacte de la disparitat HY també és significatiu a l'anàlitzar la MRT (veure apartat de Resultats I.4.2 Anàlisi individual dels antígens menors d'histocompatibilitat, I. ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT).

La presència de disparitat HY no té cap impacte sobre la SG quan s'analiza el subconjunt de pacients amb genotip +49 AA (30.2% vs 47.0%, p: 0.159). S'observa una tendència a la significació a l'anàlitzar el subconjunt de pacients amb donants amb genotip +49AG/GG (43.3% vs 50.2%, p: 0.067) (Figura 35) tot i que es descarta la disparitat de sexe com a factor de risc per a una pitjor SG en l'anàlisi multivariant (Taula 20).



**Figura 35:** Representació gràfica de variables clíniques en funció dels genotips CTLA-4 dels donants

SG en funció de la presència/absència de disparitat HY en població amb genotip +49AG/GG (verd: disparitat HY, vermell: no disparitat HY). El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

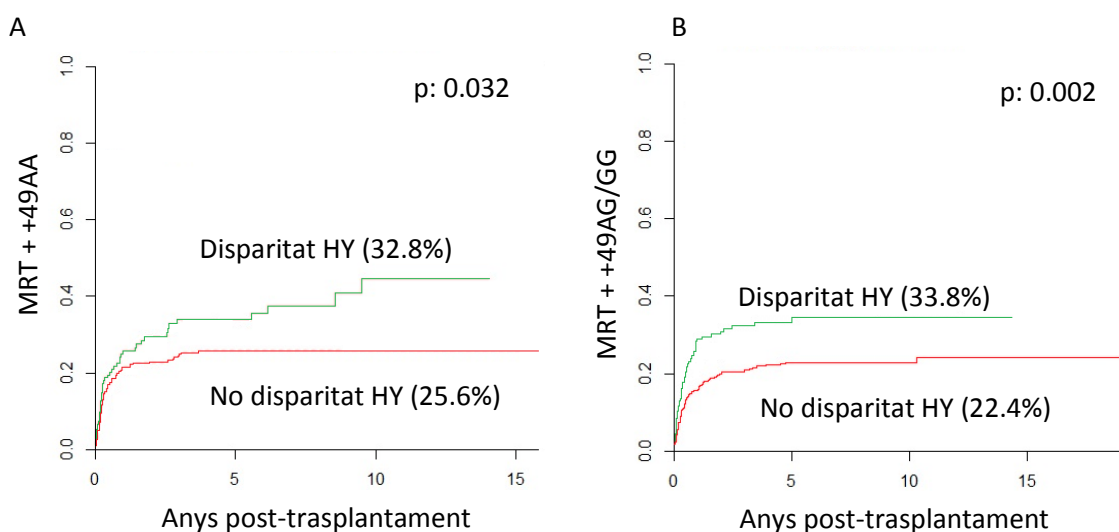
**Taula 20:** Anàlisi multivariant de SG en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4

Subpoblació	Significació estadística	HR (95%IC)
<b>+49AG/GG</b>		
Diagnòstic	0.299	1.17 (0.87-1.56)
Fase de la malaltia	<0.001	2.56 (1.91-3.43)
Font de PH	0.573	1.10 (0.79-1.53)
Règim d'acondicionament pre-trasplantament	0.536	1.13 (0.76-1.69)
Profilaxis	0.274	1.27 (0.83-1.96)
Edat	0.393	1.14 (0.84-1.54)
Disparitat HY	0.209	1.23 (0.89-1.68)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètics. El diagnòstic s'estratifica com a LA o SMD *versus* altre; la fase de la malaltia com a precoç i avançada, la font de PH s'estratifica com a SP i MO; la profilaxis com a CSA o CSA+MTX *versus* altres; el règim d'acondicionament pre-trasplantament com a acondicionament mieloablatiu o d'intensitat reduïda; l'edat, com a menors o majors de 41 anys.

Tant l'anàlisi univariant com el multivariant, mostren que la presència de disparitat HY entre donant i receptor s'associa a una major MRT (veure apartat 1.4.2 Anàlisi individual dels antígens menors d'histocompatibilitat, I. ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT).

L'anàlisi univariant en funció del genotip del polimorfisme en posició +49 de CTLA-4 mostra que la presència de disparitat HY entre donant i receptor té un impacte en la MRT en totes les subpoblacions estudiades (Figura 36). No obstant, l'anàlisi multivariant descarta la disparitat HY com a factor de risc per a una major MRT (Taula 21).



**Figura 36:** Representació gràfica de la MRT en presència o absència de la disparitat HY en funció dels genotips dels SNPs de CTLA-4

A: MRT en funció de presència/absència disparitat HY en població amb genotip +49AA; B: MRT en funció de presència/absència disparitat HY en població amb genotip +49AG/GG. En verd es representa el grup amb disparitat HY entre donant i receptor, en vermell, el grup amb absència de disparitat. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

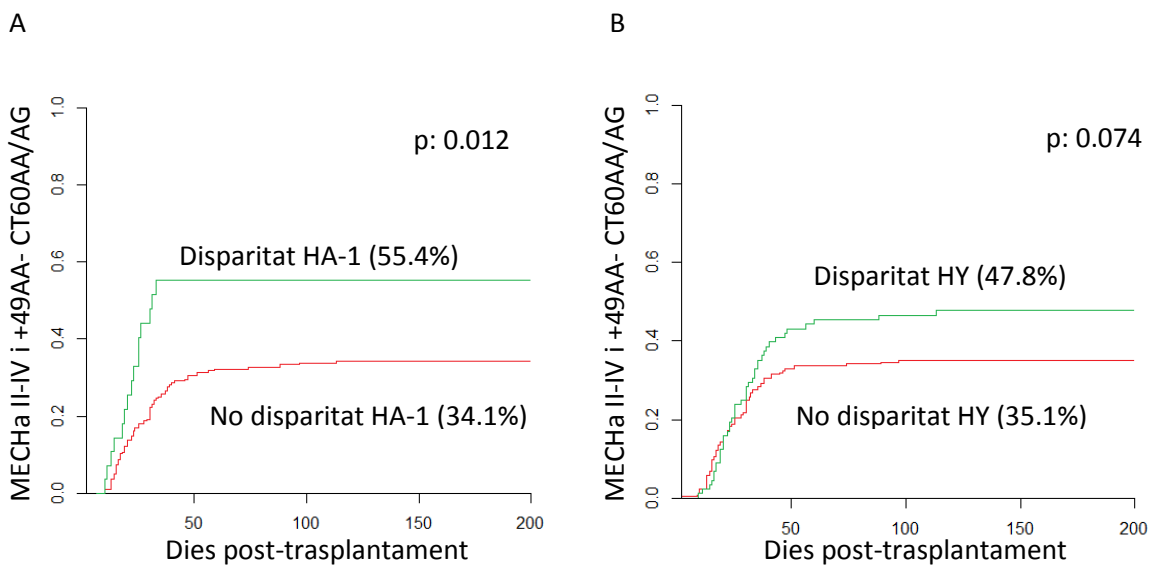
**Taula 21:** Anàlisi multivariant per MRT en l'estudi de immunomodulació dels SNPs de CTLA-4

Subpoblació	Significació estadística	HR (95%IC)
<b>+49AA</b>		
Disparitat HY	0.251	1.27 (0.84-1.92)
Diagnòstic	0.024	1.61 (1.07-2.44)
Fase de la malaltia	0.001	1.97 (1.32-2.93)
Font de PH	0.013	1.85 (1.14-2.93)
Règim d'acondicionament pre-trasplantament	0.052	1.64 (0.99-2.69)
Profilaxis	0.004	2.09 (1.27-3.43)
Edat	0.072	1.51 (0.96-2.36)
<b>+49 AG/GG</b>		
Edat	<0.001	2.05 (1.39-3.03)
Fase de la malaltia	<0.001	2.21 (1.49-3.28)
Font de PH	0.554	1.15 (0.73-1.80)
Disparitat HY	0.196	1.32 (0.87-1.99)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètic. La font de PH s'estratifica com a SP i MO; la profilaxis com a CSA o CSA+MTX *versus* altres; el règim d'acondicionament com a quimioteràpia + TBI i quimioteràpia; el diagnòstic s'estratifica com a LA o SMD *versus* altres i la fase de la malaltia, com a precoç i avançada.

### II.2.4 Resultat clínic post-al·lo-TPH associat a les disparitats en A<sub>g</sub>mH en funció de l'haplotip CTLA-4

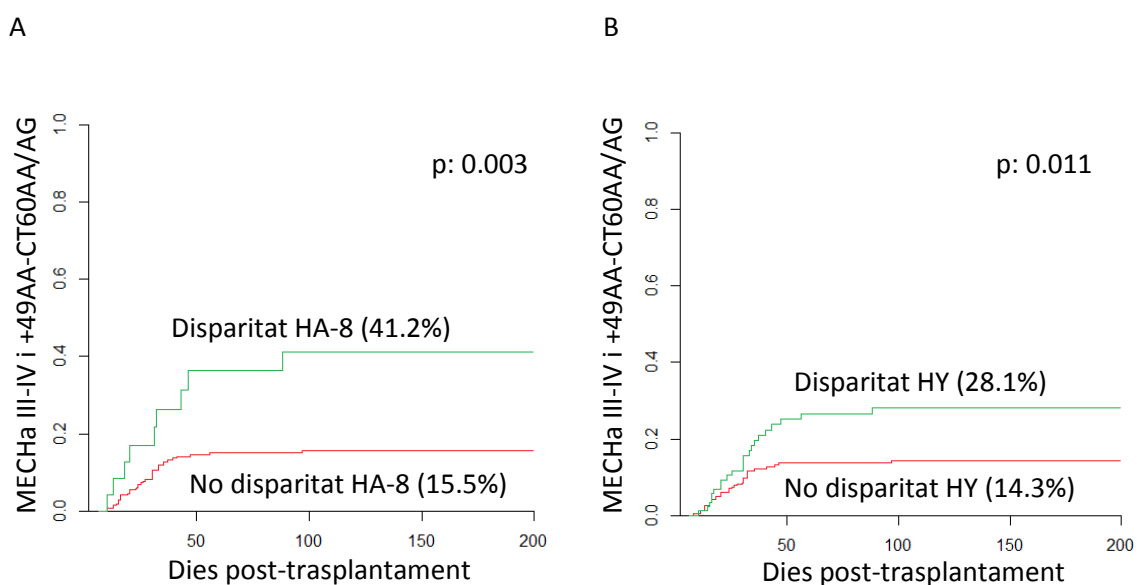
La distribució dels genotips dels polimorfismes nucleotídics +49 i CT60 és similar, acord amb el reportat prèviament en la població europea [162]. Com s'ha descrit anteriorment, trobem que l'al·lel A de l'SNP CT60 s'associa normalment, amb l'al·lel A de l'SNP +49. Aquesta forta associació fa difícil determinar l'impacte del genotip del polimorfisme CT60 en la modulació de la resposta immunitària després d'un trasplantament al·logènic. No obstant, quan es consideren el dos SNPs, aquells pacients que han estat trasplantats a partir de donants +49 homozigots per A i amb almenys una A en el genotip de CT60, presenten un increment de la incidència de MECH aguda graus II, III o IV, en presència de la disparitat HA-1 o de la disparitat HY (Figura 37), mentre que aquesta associació no es troba amb qualsevol altra combinació de genotips de CTLA-4 del donant. Aquesta associació es manté al realitzar l'anàlisi multivariant (Taula 22).



**Figura 37:** Representació gràfica MECHa graus II, III o IV en l'estudi de l'efecte de l'haplotip CTLA-4 davant de disparitats conegudes

A: MECHa II-IV en funció de presència/absència de la disparitat HA-1 en població amb genotip +49AA-CT60AA/AG; B: MECHa II-IV en funció de presència/absència de la disparitat HY en població amb genotip +49AA-CT60AA/AG. En verd es representa el grup amb disparitat entre donant i receptor, en vermell, el grup amb absència de disparitat. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

De la mateixa manera, es detecta un increment d'incidència de MECH aguda graus III o IV en presència de la disparitats HA-8 (41.2% vs 15.5%, p: 0.003) o HY (28.1% vs 14.3%, p: 0.011) només quan els donants presenten les següents combinacions de genotips: +49AA/ CT60AA o AG (Figura 38), mentre que no es detecta aquesta associació en qualsevol altra combinació de genotips de CTLA-4. Al realitzar l'anàlisi multivariant s'identifica tant la disparitat HA-8 com HY, juntament amb la font de PH com a factors de risc per al desenvolupament de MECHA graus III-IV, quan l'haplotip de CTLA-4 del donant és +49AA-CT60AA/AG (Taula 22).



**Figura 38:** Representació gràfica MECHa graus III o IV en l'estudi de l'efecte de l'haplotip CTLA-4 davant de disparitats conegudes

A: MECHa III-IV en funció de presència/absència de la disparitat HA-8 en població amb genotip +49AA-CT60AA/AG; B: MECHa III-IV en funció de presència/absència de la disparitat HY en població amb genotip +49AA-CT60AA/AG. En verd es representa el grup amb disparitat entre donant i receptor, en vermell, el grup amb absència de disparitat. El moment 0, correspon al moment del trasplantament.

**Taula 22:** Anàlisi multivariant per MEChA en l'estudi de immunomodulació de l' haplotip de CTLA-4

Variable/Subpoblació	Significació estadística	HR (95%IC)
<b>MEChA II-IV/ +49AA+CT60AA/AG</b>		
Diagnòstic	0.148	1.34 (0.90-1.98)
Font de PH	0.234	1.28 (0.35-1.92)
Profilaxis	0.595	1.15 (0.69-1.91)
Disparitat HY	0.051	1.51 (1.00-2.28)
Disparitat HA-1	<0.001	2.83 (1.63-4.93)
<b>MEChA III-IV/ +49AA+CT60AA/AG</b>		
Diagnòstic	0.392	0.77 (0.42-1.40)
Font de PH	0.027	2.16 (1.09-4.26)
Profilaxis	0.671	1.18 (0.55-2.52)
Disparitat HY	0.028	1.95 (1.07-3.55)
Disparitat HA-8	0.003	3.04 (1.46-6.31)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança; PH: progenitors hematopoètic. La font de PH s'estratifica com a SP i MO; la profilaxis com a CSA o CSA+MTX *versus* altres; el règim el diagnòstic s'estratifica com a LA o SMD *versus* altres i la fase de la malaltia, com a precoç i avançada.



# III-IMPACTE DELS POLIMORFISMES CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ T

Com es ve dient al llarg de la tesi hi ha evidències que confirmen que el genotip de CTLA-4 està associat a un increment de malalties autoimmunitàries, i de que juga un paper en el context al·loimmunitari. Inclús els resultats de l'apartat II. IMMUNOMODULACIÓ DE CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES de resultats, suggereixen que aquests polimorfismes modulen la resposta immunitària enfront de disparitats conegudes. El plantejament que sorgeix arrel d'aquestes observacions és: si s'eliminen els limfòcits T de l'empelt, on les respostes immunològiques seran mediades pels nous limfòcits T generats a partir de les cèl·lules CD34 infoses, el genotip de CTLA-4 d'aquesta repoblació de cèl·lules T segueix essent rellevant en el resultat clínic del trasplantament?

Part dels resultats d'aquest apartat es troben recollits en l'article publicat a BBMT titulat *Donor CTLA4 Genotype Influences Clinical outcome after T Cell-Depleted Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Identical Sibling*, inclòs a l'Annex II.

## III.1 AVALUACIÓ DE LA INFLUÈNCIA DELS POLIMORFISMES DE CTLA-4 DEL DONANT EN EL RESULTAT CLÍNIC POST AL·LO-TPH AMB DEPLECIÓ DE CÈL·LULES T

Tal i com s'ha comentat prèviament, els canvis nucleotídics conseqüència de l'SNP CT60, d'adenina per guanina, han estat estudiats en el context de malalties autoimmunitàries associant-se l'al·lel A com a protector, mentre que l'al·lel G, s'ha associat a un major risc pel desenvolupament o progressió d'esmentades malalties.

En el context d'un al·lo-TPH, una de les principals complicacions és l'aparició de MECH com s'ha comentat al llarg del treball, si bé la resposta observada en pacients amb aquesta complicació no és una resposta autoimmunitària pròpiament dita (atès que les cèl·lules responsables provenen del donant), el mecanisme immunològic és bastant similar. Hi ha estudis que demostren, que pacients amb donants de genotip CT60AG/GG presenten taxes de recidives considerables en comparació amb els de genotip CT60AA, i com a conseqüència es veu reduïda la supervivència global en aquest grup; així com pacients que reben un empelt a partir d'un donant amb genotip +49AG/GG, que presenten una taxa de SG inferior en comparació amb els de genotip AA [162].

En aquest apartat s'ha avaluat la influència del genotip CT60 i +49 de CTLA-4 del donant, inclús després d'una depleció exhaustiva de cèl·lules T mitjançant selecció positiva de CD34. La població d'estudi inclosa en l'estudi està descrita en Taula 4 (apartat II.3 POLIMORFISMES DE CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ DE CÈL·LULES T, II. POBLACIÓ D'ESTUDI, de MATERIALS I MÈTODES).

### III.1.1 Estudi d'homogeneïtat de la població

S'ha dividit la població d'estudi en dos grups, per una banda els pacients que han rebut un empelt amb depleció de cèl·lules T a partir d'un donant homocigot per l'al·lel associat com a protector (A) en malalties autoimmunitàries, i l'altre, en què el genotip del donant conté com a mínim una G. S'ha fet un estudi d'homogeneïtat entre grups per tal d'avaluar si són o no comparables (veure Taula 23).

Un cop realitzat l'estudi d'homogeneïtat veiem que els grups són comparables entre ells, amb l'única excepció de que els pacients amb genotip CT60AA tenen una mitjana d'edat més elevada que el pacients amb donant de genotip AG/GG (39.5 *versus* 44.7 anys, p: 0.019) (Taula 23).

**Taula 23:** Homogeneïtat dels grups d'estudi pel polimorfisme CT60 i +49

Genotip	CT60 AG/GG	CT60AA	p	+49 AG/GG	+49 AA	p
Cohort	106 (77.9%)	30 (22.1%)		61 (52.1%)	56 (47.9%)	
Edat	39.5	44.7	0.019	39.6	41.1	0.445
Sexe						
Home	56 (52.8%)	19 (63.3%)		34 (55.7%)	30 (53.6%)	
Dona	50 (47.2%)	11 (36.7%)	0.307	27 (44.3%)	26 (44.6%)	0.854
Diagnòstic						
Leucèmia aguda/ SMD	70 (66.7%)	17 (56.7%)		43 (70.5%)	33 (58.9%)	
Altres	35 (33.3%)	13 (43.3%)	0.313	18 (29.5%)	23 (41.1%)	0.254
Estat de la malaltia						
Precoç	71 (71.7%)	23 (82.1%)		44 (73.3%)	35 (72.9%)	
Avançada	28 (28.3%)	5 (17.9%)	0.267	16 (26.7%)	13 (27.1%)	1.000
Disparitat de sexe	21 (19.8%)	8 (26.7%)	0.418	13 (21.3%)	14 (25.0%)	0.666
Donant sensibilitzat	18 (22.0%)	10 (40.0%)	0.072	10 (20.8%)	14 (33.3%)	0.234
Règim d'acondicionament amb TBI	69 (66.3%)	21 (70.0%)	0.707	42 (68.9%)	39 (70.9%)	0.842
Profilaxis						
CSA	62 (58.5%)	18 (60%)		34 (58.6%)	35 (37.3%)	
CSA + MTX	11 (10.4%)	6 (20%)		11 (19.0%)	6 (11.5%)	
CSA + corticosteroides	25 (23.5%)	5 (16.7%)		13 (22.4%)	9 (17.3%)	
Altres	2 (1.9%)	0 (0%)	0.598	0 (0.0%)	2 (3.8%)	0.440
CMVd	74 (77.9%)	23 (88.5%)	0.231	37 (72.5%)	43 (84.3%)	0.228
CMVp	74 (75.5%)	24 (85.7%)	0.252	41 (73.2%)	40 (78.4%)	0.530

SMD indica Síndrome mielodisplàstica; TBI, de l'anglès "*total body irradiation*"; CSA: Ciclosporina A; MTX: metotrexat; CMV: citomegalovirus positiu. Disparitat de sexe: ha estat considerada quan el donant és una dona i el receptor un home. Donant sensibilitzat correspon als donants que han estat prèviament transfosos o embarassades.

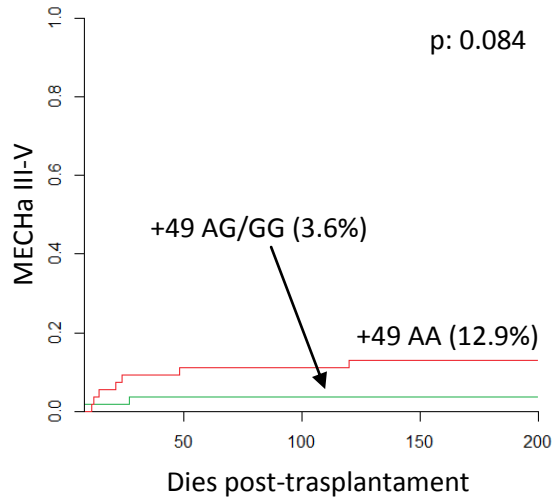
### III.1.2 Influència dels polimorfismes de CTLA-4 en MECH

#### III.1.2.1 Impacte en MECH aguda

Pel que fa al polimorfisme CT60, al realitzar l'anàlisi univariant per MECH aguda no s'observen diferències estadísticament significatives entre grups pels graus II-IV (CT60AA: 20.0% vs CT60AG/GG: 21.8%, p: 0.904), tampoc pels estadis més severos (6.6% vs 8.2%, p: 0.878).

A l'avaluar la influència del genotip +49 del donant en MECHa graus II-IV, no observem diferències entre grups en funció del genotip del donant davant d'aquesta complicació (21.8%

vs 20.7%, p: 0.935). No obstant, si que s'observa una tendència a la significació en quant a l'impacte del genotip +49 en MECHa pels graus III-IV (12.9% vs 3.6%, p: 0.084) (Figura 39). Malgrat tot, al realitzar l'anàlisi multivariant, el genotip +49 del donant queda exclòs com a factor de risc pel desenvolupament de MECHa III-IV (p: 0.833; HR: 1.16; 95%IC: 0.29-4.70).



**Figura 39:** Representació gràfica de la influència del genotip +49 del donant post-al·lo-TPH-CD34 en MECHa III-IV

En verd es representen els pacients amb donant amb genotip AG/GG; en vermell, amb genotip AA.

### III.1.2.2 Impacte en MECH crònica

S'ha volgut determinar l'efecte d'esmentats genotips en MECH crònica. En cap cas es detecten diferències significatives entre grups en funció dels genotips de CTLA-4, CT60AA: 16.7% vs CT60AG: 22.1%, p: 0.780; +49AA: 23.4% vs +49 AG/GG: 20.8%, p: 0.812.

A l'analitzar la forma extensa de MECHc, tampoc s'observa que cap dels genotips dels polimorfismes d'estudi tingui cap impacte en aquesta complicació. CT60AA: 12.5% vs CT60AG/GG: 11.6%, p> 0.999; +49AA: 10.6% vs +49AG/GG: 13.2%, p: 0.765.

### III.1.3 Influència dels polimorfismes de CTLA-4 en altres variables clíniques

#### III.1.3.1 Impacte en supervivència global

Els resultats obtinguts mostren que pacients sotmesos a trasplantament que han rebut cèl·lules a partir d'un donant amb genotip CT60 AG/GG presenten una major supervivència

global (49.4%) davant dels pacients amb donants CT60AA (35.6%), amb diferències estadísticament significatives entre grups (p: 0.043) (Figura 40A). La diferència entre grups pel que fa a SG d'acord amb el genotip dels donants esdevé més evident quan s'analitzen únicament aquells pacients trasplantats en la fase precoç de la malaltia (33.2% vs 63.1%, p: 0.003) (Figura 40B).

S'ha analitzat la supervivència global només en aquells pacients diagnosticats de leucèmia aguda o síndrome mielodisplàstica, els resultats mostren que pacients amb trasplantament de donants amb genotips CT60 AG/GG tenen una major supervivència global (49.4%), que aquells amb donants CT60AA (26.5%) amb una notable tendència a la significació (p: 0.068) (Figura 40C). Aquesta tendència queda confirmada quan s'analitzen de nou els mateixos grups només en pacients que es troben en fase precoç de la malaltia (AA: 26.9% vs AG/GG: 68.3%, p: 0.009) (Figura 40D).

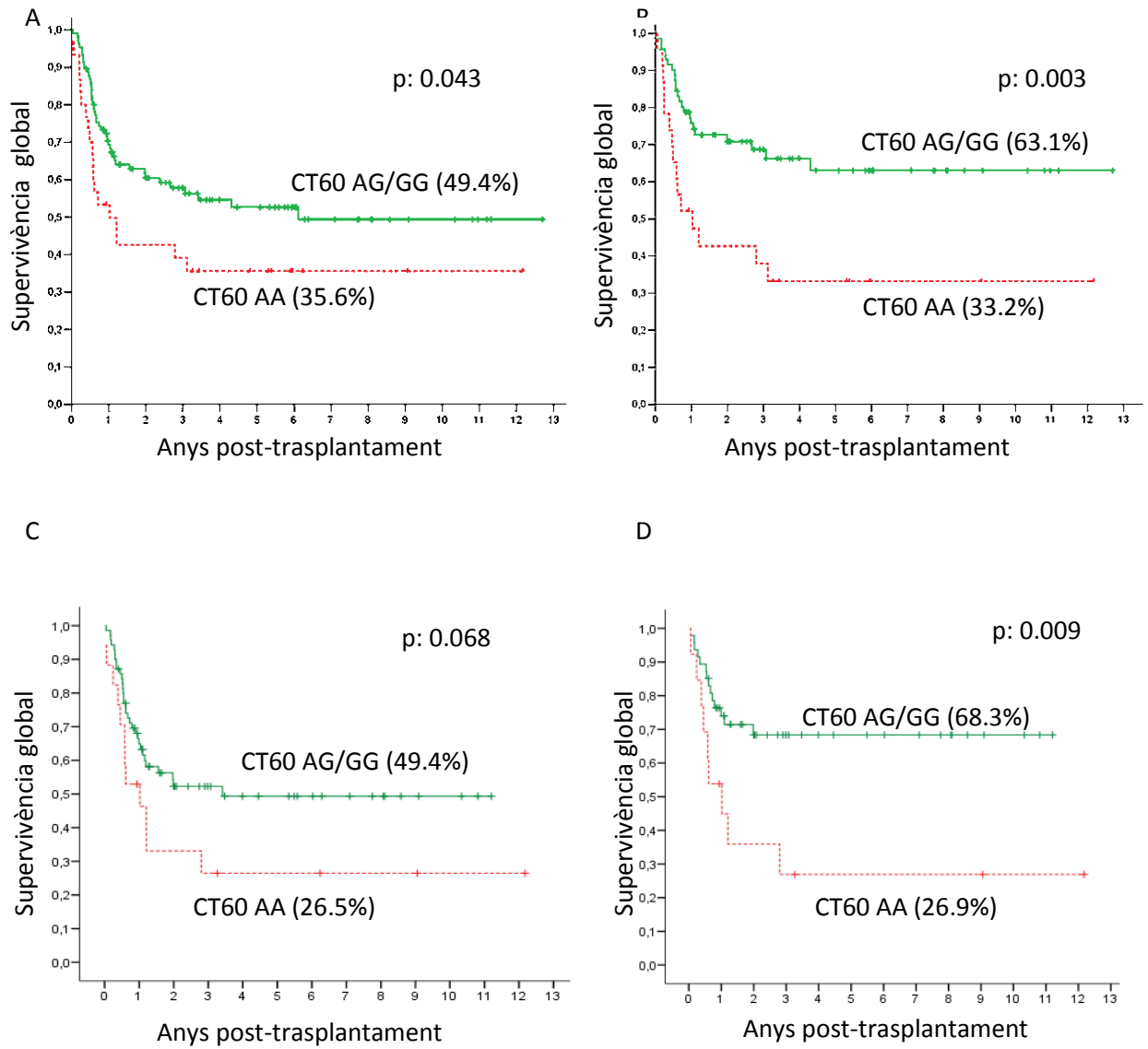
L'anàlisi univariant en funció del genotip +49 de CTLA-4, no mostra diferències estadísticament significatives entre sèries (39.5% vs 54.2%, p: 0.198). Tampoc quan s'homogeneïtza la població en funció de la fase de la malaltia (50.5% vs 62.0%, p: 0.261); o quan s'homogeneïtza la població en funció del diagnòstic, on la diferència entre conjunts és pràcticament inexistent (45.2% vs 45.4%, p: 0.868).

La significació estadística es manté al realitzar l'anàlisi multivariant per CT60, on queda confirmat el genotip d'aquest SNP del donant com a factor de risc independent per la supervivència global, on el grup de pacients amb donant CT60AA presenten 2.24 vegades més probabilitats de tenir una pitjor SG (Taula 24).

**Taula 24:** Anàlisi multivariant per SG

Variables	Significació estadística	HR (95%IC)
Règim d'acondicionament al trasplantament	0.035	1.84 (1.04-3.25)
Fase de la malaltia	0.001	2.63 (1.50-4.62)
Genotip CT60 del donant	0.008	2.24 (1.23-4.08)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança. El règim d'acondicionament al trasplantament s'estratifica en pacients que han rebut quimioteràpia + TBI i pacients que han rebut quimioteràpia, el diagnòstic està estratificat com a pacients amb LA/SMD *versus* altres; la fase de la malaltia com a precoç i avançada, genotip del donant CT60AA *versus* CT60AG/GG.



**Figura 40:** Representació gràfica de la SG post-al·lo-TPH-CD34 en funció del genotip CT60 del donant

A: en el total de la població; B: pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia; C: pacients amb diagnòstic: leucèmies agudes i SMD; D: pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia afectes de leucèmia aguda o SMD. El moment 0, correspon al moment del trasplantament. El grup de pacients trasplantats a partir d'un donant amb genotip CT60 AG/GG estan representats en verd, i en vermell, el grup de pacients trasplantats a partir de donants homozigots per l'al·lel A.

### III.1.3.2 Impacte en supervivència lliure de malaltia

S'ha avaluat l'impacte dels polimorfismes CT60 i +49 de CTLA-4 en la supervivència lliure de malaltia.

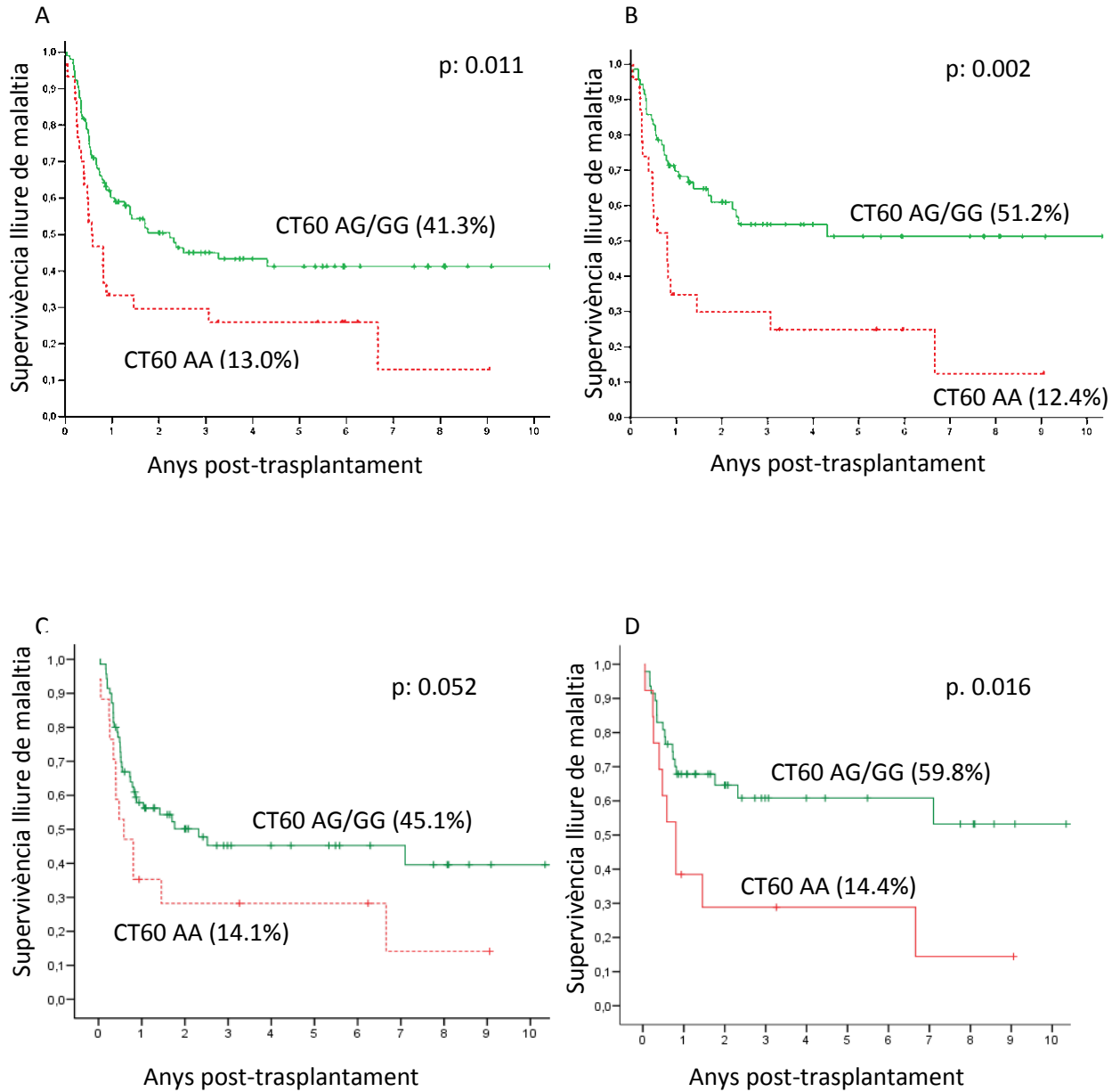
Els resultats obtinguts per CT60 mostren diferències estadísticament significatives entre grups.

Els pacients que han rebut un empelt provinent d'un donant amb genotip AG/GG presenten una millor supervivència lliure de malaltia que els pacients amb donant amb genotip AA (13.0% vs 41.3%, p: 0.011) (Figura 41A). Aquesta diferència es manté quan analitzem només aquells pacients que han estat trasplantats en fase precoç de la malaltia (Figura 41B), s'observa que el grup de donants amb genotip homozigot per G o heterozigot té una SLM un 38.8% més elevada que el grup de pacients amb donant homozigot per AA (12.4% vs 51.2%, p: 0.002).

Quan s'analitzen només aquells pacients amb leucèmia aguda o síndrome mielodisplàstica, s'observa una tendència a la significació, mantinguent-se els pacients amb donants amb genotip CT60AG/GG amb una millor SLM que els pacients amb donants amb genotips CT60 AA (14.1% vs 45.1%, p: 0.052), especialment quan es consideren únicament aquells pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia (14.4% vs 59.8%, p: 0.016) (Figura 41C i Figura 41D).

L'anàlisi univariant per avaluar l'impacte del genotip en posició +49 de CTLA-4 no mostra diferències estadísticament significatives entre sèries pel que fa a SLM (24.6% vs 19.3% , p: 0.278). Tampoc quan s'homogeneïtza la població analitzant només aquells pacients que són trasplantats en fase precoç de la malaltia (27.4% vs 22.4%, p: 0.261); i es manté la no significació quan només s'avaluen aquells pacients que han estat diagnosticats de leucèmia aguda o SMD (25.8% vs 37.5%, p: 0.499).

L'anàlisi multivariant confirma que el genotip CT60AA del donant és un factor de risc per a una pitjor SLM, juntament amb la fase de la malaltia (Taula 25).



**Figura 41:** Representació gràfica de la supervivència lliure de malaltia en funció del genotip CT60 del donant

Es considera el temps 0 el moment del trasplantament. El grup representat en vermell fa referència als pacients amb un donant homozigot per A, en verd, es representen els pacients amb un donant homozigot per G o heterozigot. A: representació del total de la població d'estudi; B: representació dels pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia; C: pacients amb diagnòstic: leucèmies agudes i SMD; D: pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia afectes de leucèmia aguda o SMD.



**Taula 25:** Anàlisi multivariant per SLM

Variables	Significació estadística	HR (95%IC)
Fase de la malaltia	0.001	3.34 (1.92-5.80)
Genotip CT60 del donant	0.001	2.94 (1.67-5.18)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança. La fase de la malaltia s'estratifica com a precoç i avançada, genotip del donant CT60AA *versus* CT60AG/GG.

### III.1.3.3 Impacte en recidives

Pel que fa a CT60, l'anàlisi univariant no troba diferències estadísticament significatives entre grups pel que fa a la incidència de recaigudes (57% vs 42.3%, p: 0.320) (Figura 42A).

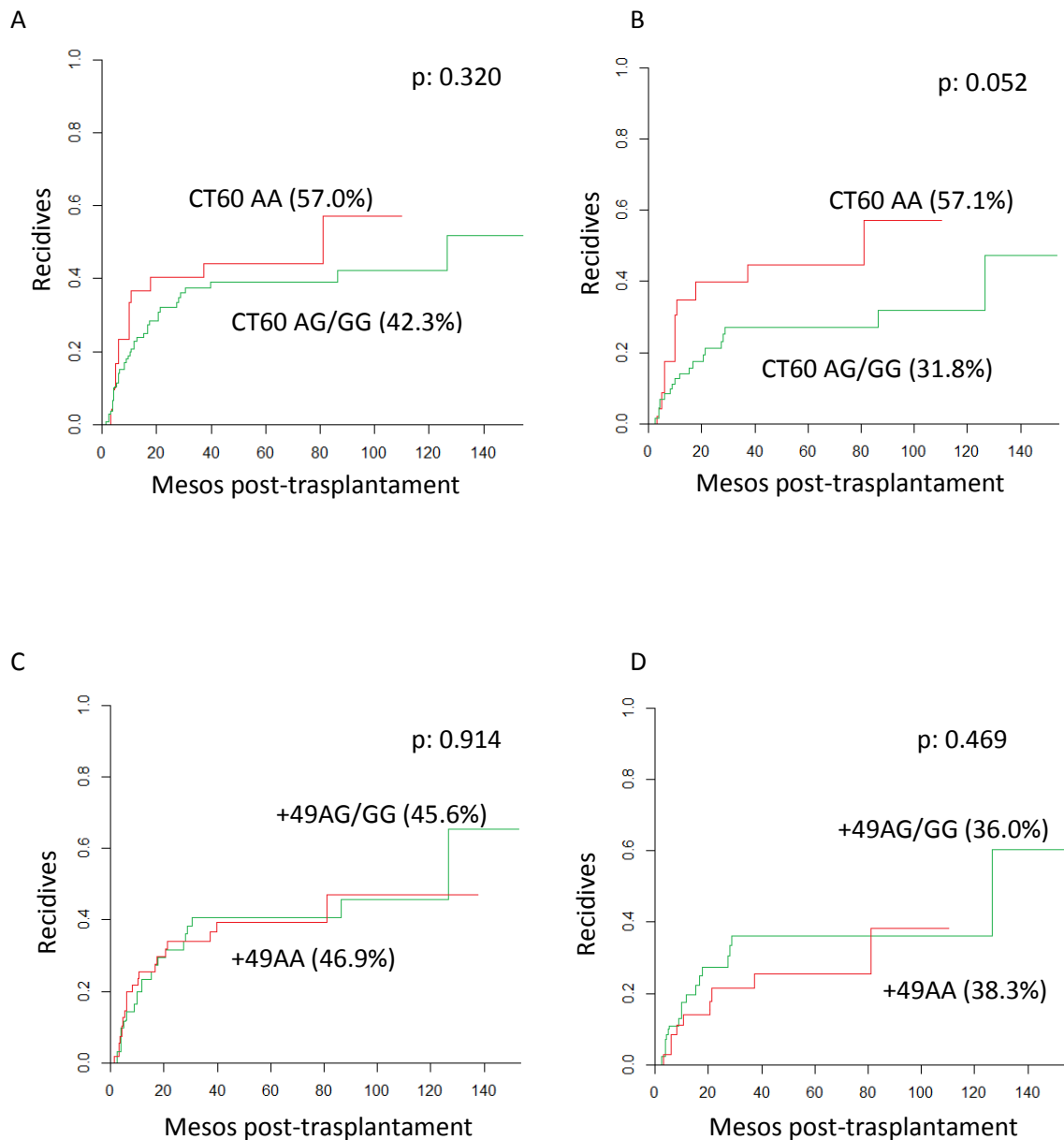
No obstant, quan es consideren únicament aquells pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia, s'observa una tendència a la significació (57.1% vs 31.8%, p: 0.052) (Figura 42B). L'anàlisi multivariant confirma aquesta tendència, identificant el genotip CT60AA de donant com a factor de risc independent per a recaigudes (Taula 26).

Referent a l'SNP en posició +49, els grups en funció del genotip no mostren diferències estadísticament significatives entre ells essent les taxes de recidives pràcticament iguals (46.9% vs 45.6%, p: 0.914) (Figura 42C). A l'homogeneïtzar la població analitzant només aquells pacients que han estat trasplantats en la fase precoç de la malaltia, tampoc es troben diferències estadístiques (38.3% vs 36.0%, p: 0.469) (Figura 42D).

**Taula 26:** Anàlisi multivariant per recidives

Variables	Significació estadística	HR (95%IC)
Fase de la malaltia	<0.001	1.16 (2.25-7.69)
Genotip CT60 del donant	0.001	3.41 (1.67-6.96)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança. La fase de la malaltia s'estratifica com a precoç i avançada, genotip del donant CT60AA *versus* CT60AG/GG.



**Figura 42:** Representació gràfica de l'impacte dels SNPs de CTLA-4 en recidives

A: representació del total de la població d'estudi de CT60; B: representació dels pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia en funció del genotip CT60; C: representació del total de la població d'estudi de +49; D: representació dels pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia en funció del genotip +49. Es considera el temps 0 el moment del trasplantament. El grup representat en vermell fa referència als pacients amb un donant homozigot per A, en verd, es representen els pacients amb un donant homozigot per G o heterozigot.

### III.1.3.4 Impacte en mort relacionada amb el trasplantament

L'anàlisi univariant per avaluar l'impacte del polimorfisme CT60 en la mort relacionada amb el trasplantament mostra una tendència a la significació (p: 0.104) (Figura 43A), essent el grup de pacients amb donants homozigots per G o heterozigots el que presenta una menor taxa de MRT (17.4%) que incrementa de manera notable en el conjunt de pacients amb donants de genotip CT60 AA (30.0%). A l'analitzar la MRT en només aquells pacients trasplantats en la fase precoç de la malaltia, es perd la tendència a la significació (30.4% vs 21.5%, p: 0.239). L'anàlisi multivariant exclou el genotip CT60 del donant com a factor de risc independent per a MRT.

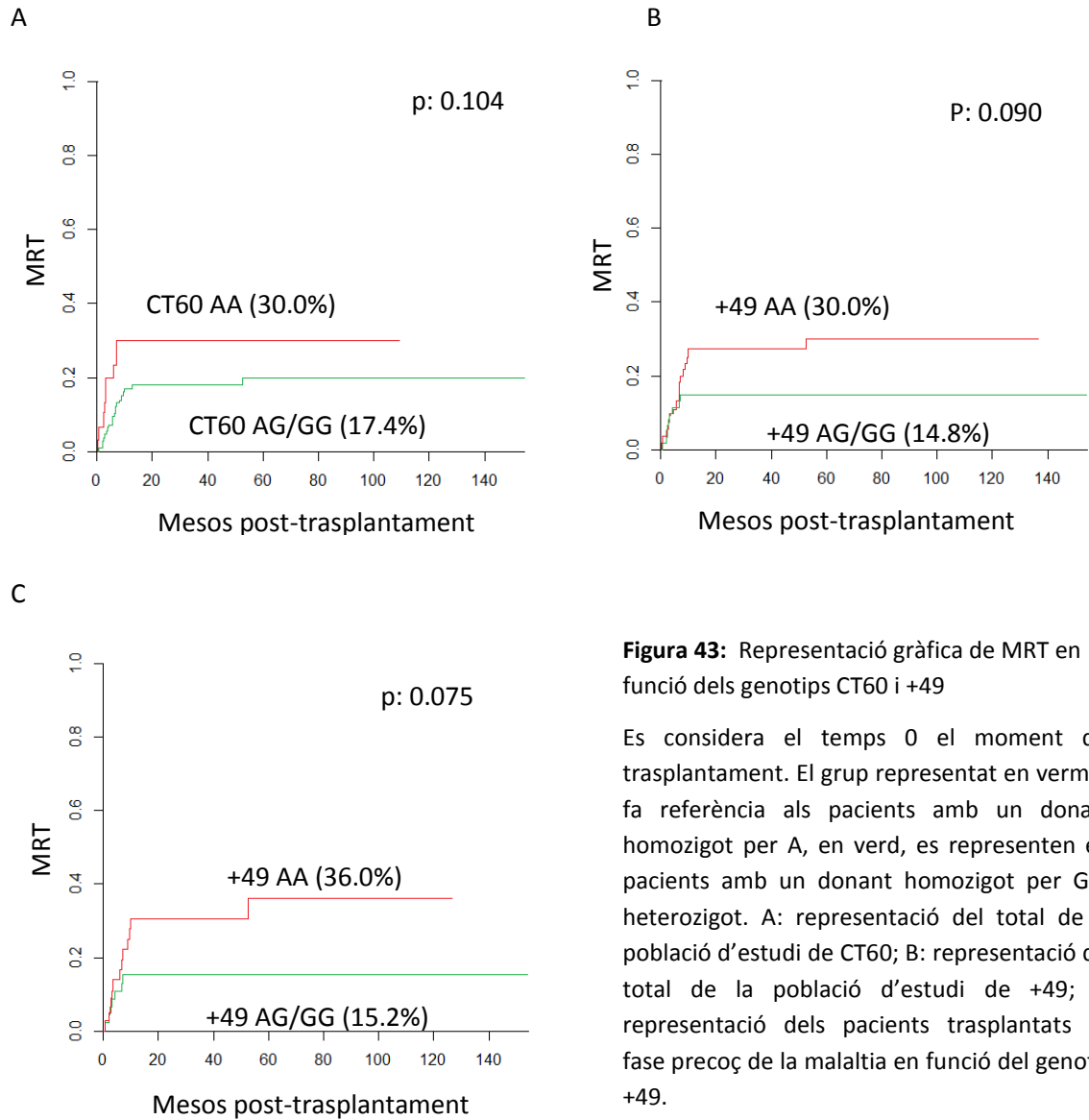
L'anàlisi estadístic del SNP +49 mostra una tendència a la significació quan s'analitza el total de la població (30.0% vs 14.8%, p: 0.090) que es manté a l'homogeneïtzar la població en funció de la fase de la malaltia, sense arribar a la significació estadística (36.0% vs 15.2%, p: 0.075) (Figura 43B i C). No obstant, al realitzar l'anàlisi multivariant no s'identifica el genotip +49 del pacient com a factor de risc.

S'inclouen en l'anàlisi multivariant el genotip CT60 i +49 del donant i el règim d'acondicionament al trasplantament per obtenir una p inferior a 0.2 en l'anàlisi univariant, i cap de les variables s'identifica com a factor de risc per a una major mort relacionada amb el trasplantament (Taula 27).

**Taula 27:** Anàlisi multivariant per MRT

Variables	Significació estadística	HR (95%IC)
Règim d'acondicionament	0.937	1.08 (0.15-7.98)
Genotip +49 del donant	0.868	1.06 (0.56-2.00)
Genotip CT60 del donant	0.164	1.63 (0.82-3.22)

HR: Hazard Ratio; IC: interval de confiança. El règim d'acondicionament s'estratifica com a quimioteràpia + TBI ("*total body irradiation*") i quimioteràpia, la fase de la malaltia s'estratifica com a precoç i avançada, genotip del donant CT60AA *versus* CT60AG/GG.



**Figura 43:** Representació gràfica de MRT en funció dels genotips CT60 i +49

Es considera el temps 0 el moment del trasplantament. El grup representat en vermell fa referència als pacients amb un donant homozigot per A, en verd, es representen els pacients amb un donant homozigot per G o heterozigot. A: representació del total de la població d'estudi de CT60; B: representació del total de la població d'estudi de +49; C: representació dels pacients trasplantats en fase precoç de la malaltia en funció del genotip +49.





# Discussió

---

*“Ciència és tot allò sobre el què hi cap sempre discussió”*

*José Ortega Gasset*





## LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Una de les limitacions a destacar a l'hora d'estudiar els antígens menors d'histocompatibilitat, tot i que no rellevant, ha estat tenir en conte les molècules de restricció HLA (presentadores dels AgsmH) doncs només s'han genotipat per a cada antigen menor les parelles positives per les molècules HLA-A\*02:01, i com a conseqüència s'ha reduït notablement el nombre de casos. No obstant, al tractar-se d'un projecte multicèntric la cohort d'estudi és suficient per obtenir conclusions estadísticament significatives. Adjacent a aquesta col·laboració, sorgeixen una sèrie de complicacions en el moment de la interpretació de resultats, ja que la pràctica i els criteris clínics poden variar entre centres, i com a conseqüència aportar un grau d'heterogeneïtat considerable a la població d'estudi. Per aquest motiu, en cada un dels estudis realitzats s'han aplicat una sèrie de criteris d'inclusió que, si bé han reduït encara més el nombre de casos, han proporcionat un grau d'homogeneïtat en les poblacions, que n'ha permès la seva comparació i posterior extracció de conclusions fiables.

Una altra de les limitacions importants a mencionar és en referència al desequilibri de la quantitat de parelles amb i sense disparitat en els anàlisis d'HA-2 i UTA2-1, on la freqüència de disparitat queda reduïda al 2.4% i 1.9% respectivament. Per tal de confirmar els resultats obtinguts, s'ha estimat que seria necessari analitzar aproximadament, una sèrie de 6500 pacients sotmesos a trasplantament. Evidentment, aquest nombre de casos d'al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic, és inabastable actualment, ni considerant estudis de cooperació internacional.

## APARTAT 1: ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT

### FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DE LES DISPARITATS EN ELS AgsmH ESTUDIATS

A l'estudiar les freqüències al·lèliques de la nostra població, veiem que no difereixen de manera significativa respecte a les freqüències reportades per altres grups en la població europea, tot i que si que s'observen lleugeres variacions en alguns d'ells.

*Spierings* i col·laboradors van reportar un treball al 2007 de freqüències genotípiques i fenotípiques de 10 AgsmH en funció de la distribució geoespacial de les poblacions [163], en el qual per a la població caucàsica, la freqüència de l'al·lel immunogènic de HA-1 va ser del 36%, idèntica a la reportada per l'equip de *Sellami* [164] i molt similar a la freqüència observada en la present tesi, del 37%. El grup holandès va descriure cert grau de variabilitat en la freqüència fenotípica de l'antigen immunogènic de HA-8 (HA-8R) depenent de la distribució geoespacial de les poblacions, la presència del fenotip antigènic (RR i RP) en regions mediterrànies va ser menor que en regions més centreeuropees [163]. No obstant, les freqüències observades per HA-8 en aquest treball són idèntiques a les reportades pel grup holandès per a la població caucàsica (HA-8R: 45% i HA8P: 55%). La freqüència del pèptid no immunogènic de UTA2-1 en la població caucàsica (23%) en aquest treball és molt similar a la descrita a *ensembl.org* (21%). Referent a HA-2, la freqüència aquí observada per l'al·lel HA-2V o immunogènic és menor que la reportada per l'equip de *Spierings* (68% i 75.6% respectivament) lluny de la reportada per *Sellami* i col·laboradors (84%). La majoria de diferències en les freqüències genotípiques entre poblacions són probablement degudes a les diferències ètniques i de distribució geogràfica [163]. L'al·lel més representat en la població és l'antigènic, el que implica que un percentatge elevat de la població presentarà fenotip antigènic (VM o VV), fet que converteix aquest pèptid en bon candidat com a diana immunoterapèutica.

La rellevància clínica dels AgsmH en l'al·lo-TPH radica en la seva capacitat al·loimmunogènica en situacions de disparitat entre individus d'una mateixa parella.

En el present treball es detecta disparitat en HA-1 en el 6.9% de parelles analitzades, similar a la reportada del grup de *Leiden* per a la població caucàsica [163].

Es van detectar disparitats en HA-2 en el 2.4% del total de la població inclosa en l'estudi, seguint les taxes teòriques proposades per l'equip de *Spierings* (0.2-2.2%). La disparitat HA-8

va tenir lloc en el 8.1% de les parelles incloses en la sèrie, el treball de *Spierings* i col·laboradors estima la freqüència de disparitat en HA-8 en la població caucàsica entre el 6.1 – 7.9% [163]. Referent a UTA2-1, només l'1.9% de la nostra cohort presenta disparitat, dades no comparables atès que no existeixen estudis bibliogràfics que en detallin les freqüències de disparitat.

Seguint els resultats reportats per *Spierings*, les disparitats en els AgsmH tindran un impacte o altre en el resultat del trasplantament en funció de la procedència de la població d'estudi. L'al·lel HLA-A\*02:01 és el més freqüent de tots els al·lells HLA-A en la població espanyola, pel què els antígens restringits per aquestes molècules són bons candidats per ésser analitzats.

Dels resultats obtinguts, arribem a la conclusió de que en els casos en què un dels dos al·lells està sobre expressat, com és el cas de HA-2 o UTA2-1, la probabilitat de que donant i receptor siguin diferents és relativament baixa, si a més tenim en compte que donant i receptor són germans i comparteixen identitat genètica, i si apliquem el criteri de disparitat, encara es fa més difícil la troballa de diferència entre individus d'una mateixa parella. Concretament, només 26 parelles van presentar disparitat per HA-2, davant de 1072, i 20 parelles de les 1041 totals van presentar-la per UTA2-1. Aquest fet suposa una limitació important a l'hora de realitzar estudis d'associació amb el resultat clínic, doncs es requereix un nombre mostral important per poder detectar disparitat entre donant i receptor per proporcionar conclusions estadísticament significatives. No obstant, si les freqüències dels al·lells són similars, la probabilitat de trobar diferències entre donant i receptor és major, i per tant, també la de detectar disparitats entre individus d'una mateixa parella.

## IMPACTE DE LES DISPARITATS ANTIGÈNIQUES EN EL RESULTAT CLÍNIC DE L'AL·LO-TPH

Com es ve dient al llarg de la tesi, per tal de que es doni una situació d'al·loreconeixement, són necessàries cèl·lules T immunocompetents del donant que reconeguin com a estranys antígens presentats en les cèl·lules del receptor i que siguin capaces d'iniciar una resposta immunitària contra ells. En aquest primer apartat s'ha estudiat l'efecte de les disparitats en els antígens menors d'histocompatibilitat restringits per les molècules HLA-A\*02:01 coneguts fins al moment del plantejament del treball en el resultat clínic del trasplantament al·logènic a partir d'un empelt de germà HLA-idèntic sense depleció de limfòcits T. Els AgsmH inclosos en l'estudi són presentats per diferents tipus cel·lulars, de manera que *a priori*, cal esperar que el resultat del trasplantament variï en funció de quina disparitat antigènica existeixi entre individus d'una mateixa parella. En la teoria, s'espera que els AgsmH restringits a teixit hematopoètic estiguin associats a una menor taxa de recidives degut a un millor control de la malaltia mínima residual com a conseqüència de l'aparició d'ECL [165], i s'estudia perspicaçment el seu ús en immunoteràpia per a combatre malalties hematològiques [166]. Per altra banda, els antígens d'expressió ubica són associats a l'aparició de MECH. No obstant, a la pràctica, diferents estudis clínics mostren que alguns antígens d'expressió restringida al llinatge hematopoètic s'associen a un increment de MECH, sense reduir la taxa de recidives [125, 126, 128,166], i AgsmH d'expressió ubica amb una major incidència de MECHa, a una menor supervivència global i a una pitjor taxa de supervivència lliure de malaltia [151].

Amb aquests antecedents, el nostre treball pretén estudiar tant els AgsmH vehiculitzats per les molècules HLA-A\*02:01 restringits a teixit hematopoètic (HA-1, HA-2 i UTA2-1), com els d'expressió ubica (HA-8 i HY) en el resultat clínic del trasplantament.

Prèviament, sobre una sèrie de 215 parelles de donant-receptor, al 2001, el nostre grup va identificar la disparitat HA-1 entre membres d'una mateixa parella com a factor de risc independent per a l'aparició de MECH aguda graus II-IV; i no es van trobar diferències estadísticament significatives a l'analitzar l'impacte d'aquest AgmH en MECH crònica, recidives ni supervivència global [126]. En aquesta tesi s'han augmentat el nombre de casos fins a 1211 parelles amb l'objectiu d'aconseguir robustesa estadística i els resultats obtinguts són comparables. Els valors obtinguts mostren una relació entre la disparitat antigènica en HA-1 entre donant i receptor, amb un increment de MECHa graus II-IV; i no s'associa la presència

d'aquesta disparitat amb MECHa en estadis més severos, recidives o supervivència global. Una hipòtesi que podria relacionar la disparitat en aquest AgmH amb l'increment de risc de MECHa graus II-IV però no amb MECHa graus III-IV, podria ser la presència d'altres disparitats en AgsmH immunodominants incloses en el grup sense disparitat, com per exemple HY, i com a conseqüència incrementés la incidència de graus III-IV en el conjunt sense disparitat. Aquest fet es tradueix en una no associació de la disparitat HA-1 amb una pitjor supervivència global. Un cop realitzat el al·lo-TPH amb acondicionament mieloablatiu, les cèl·lules presentadores d'antigen del receptor es mantenen durant un temps relativament llarg abans de ser reemplaçades per les del donant [167]. Així doncs, el temps en què els AgsmH restringits a teixit hematopoètic poden tenir cert impacte sobre MECH degut al reconeixement de les CPA és limitat. Això pot explicar perquè la disparitat en HA-1 s'associa a processos de MECH aguda i no crònica.

A més és conegut que el pèptid immunogènic (HA-1H) és capaç d'estimular les cèl·lules Th1, capaces de produir citocines pro-inflamatòries rellevants en les respostes contra malalties infeccioses, processos autoimmunitaris i teixits trasplantats, i no les Th2, capaces de produir diferents IL (-4, -5, -10) característiques de MECHc [33, 168]. Degut a la seva capacitat de generar respostes immunològiques, la seva freqüència en la població caucàsica, la seva presència en diferents malalties hematològiques i a la seva expressió aberrant en diferents tumors epitelials, HA-1 rep una atenció especial [169].

Com es menciona a l'apartat de LIMITACIONS DE L'ESTUDI, els resultats que es mostren en aquest treball referents a HA-2 han de ser considerats amb cautela, atès que existeix un desequilibri important pel que fa als casos que presenten disparitat contra els que no en presenten. De fet, els resultats obtinguts en aquesta tesi suggereixen que aquest antigen menor no té un impacte directe sobre les variables aquí estudiades, fet que insinua que HA-2 no és un antigen immunodominant com podria ser-ho HA-1. No obstant, els resultats obtinguts mostren que el grup amb disparitat en HA-2 presenta una taxa de MECHa lleugerament incrementada si es compara amb el grup que no presenta disparitat, sense significació estadística, així com un increment en quant a MRT davant la sèrie sense disparitat. Si bé no es troben diferències estadísticament significatives entre grups de amb i sense disparitat quan s'avalua l'impacte d'HA-2 en MECH crònica, els pacients que presenten disparitat per aquest antigen menor són els que presenten una taxa d'aquesta complicació més elevada; dit d'una altra manera, més de la meitat dels pacients sotmesos a al·lo-TPH presenten símptomes d'aquesta complicació, un 10.1% més que els pacients que no presenten disparitat amb els

seus donants. Nombrosos estudis descriuen que el desenvolupament de la forma crònica de MECH correlaciona amb una menor taxa de recidives en els pacients degut a un efecte ECL [22, 170-172]. A l'observar els resultats de l'impacte d'HA-2 en quant a recidives, s'observa la reducció gairebé a la meitat de recaigudes en receptors que presenten disparitat respecte el seu donant. Això podria fer pensar que els resultats observats per HA-2 en quant a paper protector davant de recaigudes podria estar tenint repercussions immunològiques, i que degut a la baixa freqüència de disparitats i la presència d'altres disparitats diferents a HA-2 incloses en el grup sense disparitat, no s'observa significació estadística.

La mateixa situació es dona a l'hora d'estudiar l'impacte de UTA2-1 en quant a freqüències, el desequilibri entre conjunts és important, i els resultats obtinguts han de ser interpretats amb prudència. Els valors obtinguts mostren que la presència d'aquesta disparitat no és condicionant en el resultat d'un al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic. No obstant, s'ha de tenir en compte el considerar aquest AgmH com a diana immunoterapèutica. *Oostvogels* i col·laboradors descriuen la presència de limfòcits T citotòxics contra UTA2-1 en un pacient que es beneficià d'un potent efecte contra leucèmia un cop infosos limfòcits del donant, després d'una recaiguda en absència de tractament immunosupressiu [136], pel que l'ús d'agents immunoterapèutics contra UTA2-1 no ha de ser despreciat, ja que alguns receptors podrien beneficiar-se d'aquesta estratègia.

Existeixen pocs treballs bibliogràfics que determinin l'impacte d'HA-8 en el context de l'al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic, i els resultats obtinguts pels diferents grups discrepen entre ells. El primer treball conegut va ser el reportat per l'equip d'*Akatsuka* i col·laboradors [173] sobre una sèrie de 577 pacients, en el que es relaciona la presència de disparitat en HA-8 amb un major risc de desenvolupament de MECH aguda graus II-IV. Al 2005, el nostre grup va fer un primer anàlisi sobre una sèrie de 146 pacients, on s'associà la disparitat en aquest AgmH amb un increment d'aparició de MECH aguda d'estadis severos (III-IV) i amb una pitjor supervivència global, i es perdia la significació en referència als graus II-IV de MECH aguda [174]. En el present treball amb una cohort de 1179 parelles, es reproduïen els resultats en referència a MECHa III-IV (23.9% vs 14.8%,  $p: 0.039$ ), però es perd la significació en supervivència global, essent el grup que presenta disparitat el que en presenta una major taxa. Cal considerar les diferències de la font de progenitors hematopoètics. En el treball del grup de *Seattle*, el 91.3% dels trasplantaments van ser realitzats a partir de moll d'os com a font de PH, mentre que en el treball de *Pérez-García*, poc més de la meitat dels trasplantaments partien d'aquesta font, la resta es van fer a partir de SP mobilitzada; i en la present tesi, l'ús de PH a

partir de SP és gairebé el doble que de MO. Existeixen diferències biològiques entre l'ús de MO o SP que afecten al resultat del trasplantament, la més important és el nombre de cèl·lules progenitores i cèl·lules accessòries (limfòcits T i B i cèl·lules *Natural Killer*) en l'empelt [175]. L'avantatge més clara de l'ús de SP mobilitzada com a font de PH és la velocitat de l'empelt degut a l'increment de fins a tres vegades més cèl·lules CD34+ que en MO, no obstant, aquestes cèl·lules progenitores no són les úniques que augmenten sota condicions de mobilització; el nombre de cèl·lules accessòries en SP és de 5 a 10 vegades major que en el MO, i són aquestes cèl·lules precisament les que juguen un paper determinant en l'evolució clínica del pacient trasplantat. En general, la presència d'aquestes cèl·lules accessòries fan que els trasplantaments a partir de SP presentin una major incidència de MECHa II-IV i III-IV que aquells realitzats a partir de MO [176]. En l'anàlisi univariant per determinar l'impacte d'HA-8 en MECHa II-IV, l'aparició d'aquesta complicació és pràcticament igual en els grups de amb i sense disparitat, el que podria explicar-se per la presència d'altres disparitats en altres AgsmH diferents a HA-8 incloses en el grup sense disparitat, com per exemple en HA-1, i com a conseqüència, incrementés la incidència de graus II-IV en el conjunt sense disparitat. Això, juntament amb el fet de que la SP mobilitzada és capaç de reconèixer major nombre d'antígens (degut al seu alt contingut de cèl·lules amb capacitat al·loreactiva) ja siguin immunodominants o no, podria ser el que justifica perquè el nostre treball no s'associa a graus II-IV.

Al 2013, l'equip de *Turpeinen* relaciona, sobre una sèrie de 311 pacients sotmesos a al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic, la disparitat en l'antigen menor HA-8 amb predisposició de desenvolupament de MECH crònica [177]. Els resultats aquí reportats no mostren aquesta associació, més bé al contrari, doncs el conjunt de la població que mostra una major taxa de MECHc és la que no presenta disparitat.

A excepció de les recidives, quan analitzem la nostra cohort en funció de la presència o absència de disparitat de sexe entre donant i receptor, la resta de variables contemplades en aquest treball mostren diferències estadísticament significatives, essent el grup amb disparitat de sexe el que presenta uns pitjors resultats clínics. De fet, existeix gran diversitat d'estudis que relacionen els antígens generats pel cromosoma Y (que s'expressen de manera ubica) amb un mal pronòstic post-al·lo-TPH quan el donant és una dona i el receptor un home. La disparitat de sexe es relaciona amb un increment de MECH, tant aguda com crònica, amb una pitjor supervivència global i amb un increment de la mort relacionada amb el trasplantament [138, 178].

Tenint en conte que la presència de polimorfismes entre individus és freqüent, i que els A<sub>gsm</sub>H deriven de proteïnes polimòrfiques, és plausible pensar que entre donant i receptor existeixi disparitat en més d'un A<sub>gsm</sub>H. S'ha estudiat si la presència d' almenys una disparitat en els antígens menors d'histocompatibilitat estudiats són motiu d'un pitjor resultat clínic. Els resultats ens mostren que, a excepció de quan s'estudia l'impacte d'almenys una disparitat en recaigudes, la presència d'una o més disparitats s'associa amb un pitjor resultat clínic. Aquests resultats són molt similars als obtinguts a l'analitzar l'impacte de la disparitat de sexe de manera individual. Una possible explicació és la immunodominància descrita d'alguns antígens menors sobre altres [117], on la disparitat de sexe tindria una dominància sobre la resta d'antígens aquí estudiats.

A l'estudiar si el nombre de disparitats entre donant i receptor tenen un efecte sumatori en quant a MECHa, tenint en compte els resultats de l'anàlisi univariant de cadascun dels A<sub>gsm</sub>H, i la dominància immunogènica dels antígens menors codificats pel cromosoma Y, ens trobem amb dos efectes contraris en funció de quins antígens estudiem conjuntament. Una hipòtesi davant els resultats obtinguts és per una banda, la immunodominància de HY sobre altres A<sub>gsm</sub>H, i per altra banda, la distribució tissular dels A<sub>gsm</sub>H. Quan es determina l'efecte de la disparitat HA-1 (antigen restringit a llinatge hematopoètic) en la població que presenta disparitat HY (antígens d'expressió ubica), no s'observen diferències estadístiques entre grups en quant a risc de desenvolupar MECHa graus II-IV. Mentre que quan s'analitza la població per la mateixa variable amb absència de disparitat de sexe, en funció de presència o absència de disparitat HA-1, s'observa una clara diferència estadística entre grups, fet que evidencia el paper dominant dels antígens codificats pel cromosoma Y. Mentre que quan s'estudia la disparitat d'HA-8 (antigen d'expressió ubica) en la població amb disparitat de sexe entre donant i receptor, no només hi ha una clara diferència entre grups en quan risc de desenvolupament de MECHa graus III-IV, sinó que sembla que estigui potenciada, si ho comparem amb els resultats de l'estudi d'HA-8 en mode individual.

La diferència de resultats entre grups podria raure, no només en la presència de més d'una disparitat entre individus d'una mateixa parella i la immunodominància d'uns antígens menors sobre altres, sinó en altres factors implicats en les respostes immunològiques, com poden ser polimorfismes en gens involucrats en la sinapsis immunològica capaços de modular la capacitat al·loreactiva dels limfòcits T, com per exemple el gen CTLA-4.



**INTERÈS CLÍNIC**

Una major comprensió de la immunobiologia dels AgsmH pot proporcionar informació per a una millor selecció de donants en cas de disposar-ne de més d'un. Podria ser interessant la tipificació antigènica en la rutina clínica per detectar aquells pacients amb risc elevat de desenvolupar MECHa en els estadis més severos amb l'objectiu d'ajudar en el desenvolupament de tractaments profilàctics de major intensitat per MECH, ajustats a cada pacient.

A més, un millor coneixement de les respostes al·loreactives mediades pels AgsmH és de rellevant importància pel desenvolupament d'estratègies basades en immunoteràpia.

La distribució ubica d'HA-8 i HY els allunya de ser bons candidats en el context de la immunoteràpia. D'altra banda, HA-1, HA-2 i UTA2-1, de restricció a llinatge hematopoètic, són considerats bones dianes immunoterapèutiques. De fet, s'han fet treballs per desenvolupar estratègies de vacunació per aquests tres AgsmH amb els que es pretén potenciar l'efecte antileucèmic de ECL (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00943293?term=HA-1+vaccine&rank=1>) [179, 180].

## **APARTAT 2: MODULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA SEGONS EL GENOTIP CTLA-4 DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES**

### **FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES I GENOTÍPIQUES DE LES DISPARITATS EN ELS POLIMORFISMES CT60 I +49 DE CTLA-4**

Les freqüències al·lèliques i genotípiques obtingudes pel polimorfisme en posició +49 són pràcticament iguals a les reportades pel nostre grup prèviament, així com les freqüències al·lèliques i genotípiques del polimorfisme nucleotídic CT60.

### **INFLUÈNCIA DEL GENOTIP CTLA-4 DEL DONANT EN LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA DAVANT DE DISPARITATS CONEGUDES POST-AL·LO-TPH**

Les respostes immunològiques que tenen lloc després d'un trasplantament al·logènic poden donar lloc al desenvolupament de MECH, el què condiciona el resultat clínic del procediment. En els trasplantaments al·logènics a partir d'un donant no emparentat la principal causa d'aparició de MECH és la variabilitat de les molècules HLA entre pacient i donant, situació que no es dona quan el trasplantament es fa a partir d'un germà HLA-idèntic. Tot i que els A<sub>gsm</sub>H han estat descrits com a responsables de MECH aguda, els resultats obtinguts entre grups són variables i motiu de debat.

Els resultats reportats en aquest treball suggereixen que el genotip de CTLA-4 podria estar modulant l'habilitat dels limfòcits T en el desenvolupament de respostes immunitàries davant de la presència de disparitats en A<sub>gsm</sub>H específics. Dit d'una altra manera, el genotip CTLA-4 podria estar fent que els limfòcits T siguin més més o menys tolerants en front la presència de disparitats en els A<sub>gsm</sub>H estudiats, generant més o menys resposta al·loimmunitària.

Fins al moment, tots els treballs publicats que estudien l'associació de la presència d'una disparitat concreta amb el desenvolupament de MECH aguda, han estat dissenyats assumint que la simple presència d'una disparitat és suficient per al desenvolupament d'una resposta al·loimmunitària. Les nostres observacions suggereixen que la presència d'una disparitat podria ser necessària però no decisiva en el desenvolupament d'aquesta resposta. La resposta immunitària varia entre individus que presenten la mateixa disparitat amb el seu respectiu

donant, pel què la resposta immunitària deu estar modulada per la base genètica del donant, com poden ser gens implicats en la coestimulació o en la inhibició, com per exemple CTLA-4. En altres paraules, és necessari considerar el potencial al·loreactiu dels limfòcits T del donant quan s'estudien els efectes de disparitats genètiques.

Aquesta hipòtesi és avalada per una altra evidència que suggereix que factors addicionals poden condicionar la resposta immunitària en presència d'una disparitat específica. *Petersdorf* i col·laboradors [181] han descrit recentment que l'al·lel G del polimorfisme nucleotídic rs9277534 de la molècula HLA-DPB1 és decisiu per l'increment de risc de desenvolupar MECH aguda post-al·lo-TPH a partir d'un donant no emparentat entre els quals existeix disparitat HLA-DPB1, per sobre i més enllà de la pròpia disparitat.

Els nostres resultats mostren com les disparitats HA-1, HA-8 i HY s'associen a una major incidència de MECH aguda només quan el donant és homozigot per A en el polimorfisme +49 (rs231775) de la molècula CTLA-4. Aquest SNP es localitza a l'exó 1 i provoca una substitució aminoacídica d'una alanina (A) per una treonina (T) en el pèptid "leader" de direccionament cap a RE.

Es desconeix quin és el mecanisme de com actua el genotip +49AA en la modulació de la resposta immunitària. El nostre grup va descriure al 2007, que la quantitat de la forma soluble de CTLA-4 és més elevada en aquells individus amb genotip +49AA que en individus amb almenys un al·lel G en el seu genotip [162]. S'observen els mateixos patrons en quant a la producció de sCTLA-4 en els individus que presenten un genotip homozigot per A del polimorfisme CT60. Una possible explicació podria ser que una major quantitat de sCTLA-4 podria interferir en la sinapsis immunològica bloquejant els receptors B7 de les CPAs, evitant que la forma fICTLA-4 interaccionés amb els receptors B7, el que es traduiria en un no inici la senyal inhibidora dels limfòcits T de manera que aquests continuarien actius davant de l'antigen immunogènic.

El fort desequilibri de lligament entre l'al·lel A de +49 i l'al·lel A de CT60 fa difícil determinar quin és l'efecte individual de cada polimorfisme en la modulació de la resposta immunitària davant de disparitats específiques.

Tot i l'absència de treballs que estudiïn la modulació de la resposta immunitària en presència d'al·loantígens, els resultats aquí trobats podrien ser traslladats al context de la immunoteràpia. *Breunis* i col·laboradors [182] van descriure que en pacients amb melanoma

metastàtic, el genotip homozigot per A del polimorfisme en posició +49 s'associava a una major resposta a ipilimumab, un anticòs contra CTLA-4, suggerint que la base genètica del pacient podria ser també rellevant a l'hora de tractar tumors malignes mitjançant la inhibició dels punts de control immunològic.

Són necessaris futurs treballs que estudiïn la modulació de la resposta immunitària davant dels antigens menors d'histocompatibilitat en funció del genotip CTLA-4 del donant i la potencial traducció al camp de la immunoteràpia.

## INTERÈS CLÍNIC

Aquest treball posa de manifest la rellevància del polimorfisme nucleotídic en posició +49 de la molècula CTLA-4 davant de la presència de les disparitats antigèniques entre donant i receptor en el resultat clínic post-al·lo-TPH. La introducció de la tipificació de +49 juntament amb la genotipació de disparitats en antigens menors en la rutina clínica, podria ésser interessant per a la identificació d'individus amb alt risc de desenvolupar MECHa en els estadis més severos amb l'objectiu d'ajudar en el desenvolupament de tractaments profilàctics de major intensitat per MECH, i poder ajustar-los en la mesura del possible a cada pacient.

A més de la seva utilitat com a marcador pronòstic del trasplantament al·logènic, CTLA-4 és una molècula d'actual interès des del punt de vista immunoterapèutic. Actualment existeixen fàrmacs que bloquegen CTLA-4, mitjançant antagonistes de CTLA-4 o receptors "esquer", que resultaran en una intensificació de la resposta immunitària degut a quedar impedita la inactivació del limfòcit T. Com a antagonistes s'utilitzen anticossos monoclonals que inhibeixen el punt de control immunològic de CTLA-4, potenciant la resposta immunitària mitjançant els limfòcits T, augmentant el nombre de cèl·lules T efectores que es mobilitzen per a un "atac" immunològic contra les cèl·lules tumorals, com per exemple ipilimumab en pacients amb melanoma avançat (irressecable o metastàtic). En aquest sentit, existeixen estudis clínics que pretenen determinar l'ús de ipilimumab per tractar pacients de malalties hematològiques que recauen després d'un trasplantament de progenitors hematopoètics ([https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01822509/2016\\_01\\_11](https://clinicaltrials.gov/archive/NCT01822509/2016_01_11)), així com l'ús d'aquests anticossos bloquejants de CTLA-4 en el tractament de pacients sotmesos a al·lo-TPH amb càncers persistents o progressius (<https://clinicaltrials.gov/ct2/archive/NCT00060372>).

### APARTAT 3: IMPACTE DELS POLIMORFISMES CTLA-4 EN EL CONTEXT DE DEPLECIÓ T

El nostre grup ha descrit prèviament com els polimorfismes de la molècula CTLA-4 estan involucrats en la resposta immunològica post-al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic, així com la vigilància immunològica condueix a una menor incidència de recidives en pacients de leucèmia aguda que es troben en remissió completa [162, 183]. No obstant, no existeixen estudis en la bibliografia que relacionin el paper dels polimorfismes de CTLA-4 en el context post-al·lo-TPH amb depleció de cèl·lules T. A l'eliminar els limfòcits T de l'empelt, les respostes immunològiques, incloent el reconeixement de la malaltia mínima residual, seran mediades pels nous limfòcits T generats a partir de l'empelt. Aquesta repoblació de cèl·lules T és, normalment retrassada, degut a la selecció positiva de CD34 [184], i una pregunta per respondre és si el genotip de CTLA-4 d'aquest nous limfòcits T segueix essent rellevant en el resultat clínic del trasplantament.

En la present tesi s'identifica el genotip CT60 AA de CTLA-4 com a factor de risc independent per una pitjor supervivència global post-al·lo-TPH-CD34. Aquesta pitjor SG s'associa amb un increment de risc de recidives, suggerint que CTLA-4 podria desenvolupar un paper important en la modulació del reconeixement de malaltia mínima residual, inclús quan els limfòcits T són generats a partir de l'empelt de cèl·lules CD34. Els resultats suggereixen que el genotip CTLA-4 és capaç de distingir dues poblacions de pacients, per una banda beneficia els pacients amb un donant de genotip CT60 AG/GG amb cert efecte ECL, mentre que el grup de la població amb donant de genotip CT60AA no es veu afavorit.

Per altra banda, el genotip CT60 no té cap impacte en la incidència de MECH aguda o crònica. En el cas de MECHa podria explicar-se per la no presència de limfòcits T del donant durant els primers mesos post-al·lo-TPH. El que sí que és destacable és la reducció de recidives sense un increment de risc de desenvolupament de MECHc, el que suggereix una separació entre els efectes beneficiosos d'ECL i els perjudicials de MECH en aquests pacients.

Dels resultats obtinguts, se'n destaca l'associació observada entre el genotip CT60 AG/GG i la disminució de la taxa de recidives i una millor supervivència global, ja que altres estudis relacionen aquest genotip amb una major incidència de malalties autoimmunitàries [185], així

com la disminució de taxa de recidives observada en pacients afectes de LA en remissió completa amb donants de genotip CT60AG/GG [176]. En conjunt, aquestes observacions suggereixen una disminució de la resposta inhibidora de CTLA-4 davant l'activació de les cèl·lules T, que es tradueix en una millor "vigilància" immunitària en presència d'almenys un al·lel G.

Sorprenentment, aquest genotip ha estat relacionat no només amb menys incidència de MECHa, sinó també amb una major taxa de recidives i pitjor supervivència global post-al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic sobre una sèrie de pacients sotmesos a acondicionament mieloablatiu als que se'ls hi ha infós l'empelt sense deplecionar [162]. La hipòtesi d'aquestes diferències en el mecanisme de comportament en un i altre context al·logènic, s'atribueix a la disminució de la producció de la isoforma sCTLA-4 en presència del genotip CT60AG/GG, la qual podria ser important en la modulació de la resposta immunitària davant de pèptids al·logènics, com ara els antígens menors d'histocompatibilitat. No obstant, els resultats aquí reportats proporcionen noves dades sobre el paper de CTLA-4 post-al·lo-TPH, el que insinua que la resposta dels limfòcits T és diferent quan aquestes cèl·lules s'infonen juntament amb l'empelt, o quan són generades de nou a partir de les cèl·lules mare multipotents. Una possible explicació a aquesta observació podria ser que la repoblació de limfòcits T post-al·lo-TPH amb selecció positiva de CD34 tarda uns tres mesos [184], quan les cèl·lules presentadores d'antigen ja han estat reemplaçades per les del donant [186, 187]. Com a conseqüència d'aquest canvi, les noves CPAs no presentaran pèptids procedents de proteïnes endògenes del receptor com els AgsmH, el que deixa un escenari immunològic similar al d'un trasplantament autòleg.

## INTERÈS CLÍNIC

Enllaçat amb l'apartat anterior, s'evidencia la importància, en aquest cas del polimorfisme CT60 de CTLA-4 en el context d'un al·lo-TPH a partir d'un germà HLA-idèntic, a partir d'un empelt lliure de cèl·lules T. Seguint en la línia dels apartats anteriors, la introducció de la tipificació dels polimorfismes de CTLA-4 dels donants en la rutina clínica, podria ser de gran utilitat per a la identificació d'individus amb elevat risc de recidivar, amb l'objectiu de fer un millor control de la malaltia mínima residual, ajustant el tractament post-al·lo-TPH a cada pacient.

# Conclusions

---

*“Els moments finals d’una experiència determinen el record que conservarem de la mateixa”*

*Daniel Kahneman*





- 1)** La presència de disparitats entre donant i receptor de trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics en els antígens menors d'histocompatibilitat poden modificar el resultat del mateix.
- 2)** Els antígens menors d'histocompatibilitat estudiats en la present tesi presenten diferent dominància immunològica, pel què el resultat clínic després d'un trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics podria dependre, en mesura, de quines disparitats presentin els individus d'una mateixa parella.
- 3)** Els antígens menors d'histocompatibilitat d'expressió ubica tenen un efecte sumatori que es tradueix amb un increment de risc de desenvolupament de MECHa III-IV.
- 4)** La resposta immunològica davant les disparitats en els antígens menors d'histocompatibilitat està modulada pel genotip CTLA-4 del donant.
- 5)** El genotip de CTLA-4 té influència en les respostes immunològiques després d'un trasplantament al·logènic a partir d'un germà HLA-idèntic, fins i tot després d'una depleció exhaustiva de cèl·lules T.



# Bibliografia

---

*“Els llibres em van ensenyar a pensar, i el pensament em  
va fer lliure”*

*Ricardo León*



1. Ortega, A.V., *HEMATOLOGÍA Fisiopatología y Diagnóstico*, J.P.G. Iván Palomo G., Julia Palma B., Editor 2014, Universidad de Talca: Talca-Chile.
2. *Nanog international LIFESCIENCE*. 28/05/2015]; Umbilical Cord Bank]. Available from: <http://www.nanoginternational.com/international/eng/smart-perche-smartbank.asp>.
3. Chafuen, S. 2011; Available from: <http://www.nat-n-bio.santotomas.edu.bo/2011/05/conocimientos-generales-respuestas-11-a-20/>.
4. Parham, P., *Inmunología*, 2006, Ed. Panamericana: Mexico. p. 560.
5. Bokoch, G.M., *Chemoattractant signaling and leukocyte activation*. *Blood*, 1995. **86**(5): p. 1649-60.
6. Thomas, E.D., *A history of haemopoietic cell transplantation*. *Br J Haematol*, 1999. **105**(2): p. 330-339.
7. Lorenz, E., et al., *Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections*. *J Natl Cancer Inst*, 1951. **12**(1): p. 197-201.
8. Downey, H., *Cytology of rabbit thymus and regeneration of its thymocytes after irradiation; with some notes on the human thymus*. *Blood*, 1948. **3**(12): p. 1315-41.
9. Jacobson, L.O., *Further studies on factor influencing recovery from radiation injury*. *Proc Inst Med Chic*, 1951. **18**(13): p. 300-1.
10. Urso, P. and C.C. Congdon, *The effect of the amount of isologous bone marrow injected on the recovery of hematopoietic organs, survival and body weight after lethal irradiation injury in mice*. *Blood*, 1957. **12**(3): p. 251-60.
11. Jacobson, L.O., et al., *The role of the spleen in radiation injury and recovery*. *J Lab Clin Med*, 1950. **35**(5): p. 746-70.

12. Mathe, G., et al., *[Trial treatment of patients afflicted with acute leukemia in remission with total irradiation followed by homologous bone marrow transfusion]*. Rev Fr Etud Clin Biol, 1959. **4**: p. 675-704.
13. Bekkum, D.W.v. and M.J.d. Vries, *Radiation chimaeras* 1967, London, New York: Logos Press, Academic Press. x, 277 p.
14. Bach, F.H., et al., *Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome*. Lancet, 1968. **2**(7583): p. 1364-6.
15. Thomas, E.D., et al., *Aplastic anaemia treated by marrow transplantation*. Lancet, 1972. **1**(7745): p. 284-9.
16. Gatti, R.A., et al., *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*. Lancet, 1968. **2**(7583): p. 1366-9.
17. Carreras i Pons, E., *Manual del trasplante hemopoyético*. 2a ed 2000, Collbató: Antares. 396 p.
18. Schmitz, N., et al., *Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor)*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1666-72.
19. Winslow, T. *Medical and scientific illustration*. Available from: <http://www.teresewinslow.com/>.
20. *Trasplante de Células Madre de Sangre del Cordón Umbilical*. Available from: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Trasplante+de+C%C3%A9lulas+Madre+de+Sangre+del+Cord%C3%B3n+Umbilical&lang=2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Trasplante+de+C%C3%A9lulas+Madre+de+Sangre+del+Cord%C3%B3n+Umbilical&lang=2).
21. Barnes, D.W., et al., *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. Br Med J, 1956. **2**(4993): p. 626-7.

22. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
23. Federmann, B., et al., *Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1523-31.
24. Bashey, A., et al., *Comparison of Outcomes of Hematopoietic Cell Transplants from T-Replete Haploidentical Donors Using Post-Transplantation Cyclophosphamide with 10 of 10 HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 Allele-Matched Unrelated Donors and HLA-Identical Sibling Donors: A Multivariable Analysis Including Disease Risk Index*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015.
25. Wolin, M.J. and R.L. Rigor, *Acute graft-versus-host disease in a recipient of a twin blood cell transplant*. Bone Marrow Transplant, 1996. **17**(1): p. 125-6.
26. Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy, *Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 139-70.
27. Giralt, S., et al., *Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy*. Blood, 1997. **89**(12): p. 4531-6.
28. Slavin, S., et al., *Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases*. Blood, 1998. **91**(3): p. 756-63.
29. Aschan, J., *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: conditioning*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(2): p. 295-310.

30. Wagner, J.E., et al., *Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial*. Lancet, 2005. **366**(9487): p. 733-41.
31. Holler, E., *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: GvHD prevention and treatment*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(2): p. 281-94.
32. van Laar, J.M. and A. Tyndall, *Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(10): p. 1187-93.
33. Lorenzo Pérez, R., *Estudio del efecto de las células madre mesenquimales sobre el segmento anterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular*, 2012, Ediciones Universidad Salamanca,: Salamanca. p. 1 disc òptic (CD-ROM).
34. Velásquez Lopera M, V.O.A., Villegas Hernández A, White Burgos A, Zapata Agudelo EM, Zapata Sánchez A, *Cirugía: Trasplantes*2005: Editorial Universidad de Antioquia.
35. Ferrara, J.L., R. Levy, and N.J. Chao, *Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 1999. **5**(6): p. 347-56.
36. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
37. Panoskaltsis-Mortari, A., et al., *Keratinocyte growth factor administered before conditioning ameliorates graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3960-7.
38. Sun, Y., et al., *Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances*. Transl Res, 2007. **150**(4): p. 197-214.



39. Theobald, M., et al., *Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings*. N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1613-7.
40. Reddy, P. and J.L. Ferrara, *Immunobiology of acute graft-versus-host disease*. Blood Rev, 2003. **17**(4): p. 187-94.
41. Levine, J.E., et al., *Improved accuracy of acute graft-versus-host disease staging among multiple centers*. Best Pract Res Clin Haematol, 2014. **27**(3-4): p. 283-7.
42. Negroni, M., *Microbiología estomatológica : fundamentos y guía práctica*. 2a ed2009, Buenos Aires etc.: Médica Panamericana. XVI, 638 p.
43. [listed], N.a., *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 921-3.
44. *hla.alleles.org*. Available from: <http://hla.alleles.org/genes/index.html>.
45. *EMBL-EBI*. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>.
46. Goldberg, A.C. and L.V. Rizzo, *MHC structure and function - antigen presentation. Part 1*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(1): p. 153-156.
47. Hershberg, R.M., et al., *Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 792-803.
48. *Facultat de Medicina-Universitat Nacional del Nordest* Available from: [www.med.unne.edu.ar](http://www.med.unne.edu.ar)

49. Carroll, M.C., et al., *Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8535-9.
  
50. Sargent, C.A., I. Dunham, and R.D. Campbell, *Identification of multiple HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region*. EMBO J, 1989. **8**(8): p. 2305-12.
  
51. Alonso, A., *Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento en Reumatología* Editorial Médica Panamericana s.A
  
52. Hawai'i, U.o. *Chapter 9 -The Major Histocompatibility Complex in the Immune Response*. Available from:  
[http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/The\\_MHC\\_chap9/The\\_MHC\\_chap9.htm](http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/The_MHC_chap9/The_MHC_chap9.htm).
  
53. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis*. Nature, 1974. **251**(5475): p. 547-8.
  
54. Dustin, M.L. and E.O. Long, *Cytotoxic immunological synapses*. Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 24-34.
  
55. Davignon, D., et al., *Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4535-9.
  
56. Geiger, B., D. Rosen, and G. Berke, *Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 137-43.

57. Ryser, J.E., et al., *The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin.* J Immunol, 1982. **128**(3): p. 1159-62.
58. Norcross, M.A., *A synaptic basis for T-lymphocyte activation.* Ann Immunol (Paris), 1984. **135D**(2): p. 113-34.
59. Sloan-Lancaster, J., B.D. Evavold, and P.M. Allen, *Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells.* Nature, 1993. **363**(6425): p. 156-9.
60. Viola, A. and A. Lanzavecchia, *T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds.* Science, 1996. **273**(5271): p. 104-6.
61. Schwartz, R.H., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.* Science, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
62. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy.* Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 445-80.
63. DeSilva, D.R., K.B. Urdahl, and M.K. Jenkins, *Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation.* J Immunol, 1991. **147**(10): p. 3261-7.
64. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones.* Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
65. Shahinian, A., et al., *Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice.* Science, 1993. **261**(5121): p. 609-12.
66. Jenkins, M.K., et al., *CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells.* J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2461-6.

67. Martin, P.J., et al., *A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes*. J Immunol, 1986. **136**(9): p. 3282-7.
68. Kuchroo, V.K., et al., *B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy*. Cell, 1995. **80**(5): p. 707-18.
69. Ward, S.G., et al., *Inhibition of CD28-mediated T cell costimulation by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 526-32.
70. Wu, L.X., et al., *CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 180-94.
71. Girvin, A.M., et al., *A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 136-43.
72. Swallow, M.M., J.J. Wallin, and W.C. Sha, *B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 423-32.
73. Yu, H., et al., *Effect of soluble inducible costimulator level and its polymorphisms on age-related macular degeneration*. DNA Cell Biol, 2013. **32**(12): p. 717-21.
74. Chen, L., *The B7-CD28 family molecules* 2003, Georgetown, Tex. New York, N.Y.: Landes Bioscience/Eurekah.com; Kluwer Academic/Plenum. 141 p.
75. Nanji, S.A., et al., *Combination therapy with anti-ICOS and cyclosporine enhances cardiac but not islet allograft survival*. Transplant Proc, 2003. **35**(7): p. 2477-8.
76. *CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 [ Homo sapiens (human) ]*. 12-May-2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/958#bibliography>.

77. Merino, J., et al., *Inhibition of B-cell death does not restore T-cell-dependent immune responses in CD40-deficient mice*. Immunology, 2003. **109**(4): p. 504-9.
78. Murphy, M.J., *Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets in melanoma*. Current clinical pathology 2012, Totowa, N.J.: Humana. xiv, 322 p.
79. Burrell, B.E., *The CD40:CD40 Ligand Costimulation Pathway in Transplantation* 2008: ProQuest LLC.
80. Williams, J.A., X. Tai, and R.J. Hodes, *CD28-CD80/86 and CD40-CD40L Interactions Promote Thymic Tolerance by Regulating Medullary Epithelial Cell and Thymocyte Development*. Crit Rev Immunol, 2015. **35**(1): p. 59-76.
81. *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 [ Homo sapiens (human) ]* 4-May-2015 29/05/2015]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7293>.
82. Tsukada, N., et al., *Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2000. **95**(7): p. 2434-9.
83. *TNFRSF9 tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 [ Homo sapiens (human) ]* Gene ID: 3604. 24/05/2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3604>.
84. Harper, K., et al., *CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location*. J Immunol, 1991. **147**(3): p. 1037-44.
85. Linsley, P.S., et al., *CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 561-9.

86. Brunet, J.F., et al., *A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 267-70.
87. Edaurdo Diaz-Rubio, J.G.-C., *Oncología Clínica Básica* 2000: Arán ediciones SA.
88. Walker, L.S. and D.M. Sansom, *Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology*. Trends Immunol, 2015. **36**(2): p. 63-70.
89. Walunas, T.L., et al., *CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 405-13.
90. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
91. Waterhouse, P., et al., *Normal thymic selection, normal viability and decreased lymphoproliferation in T cell receptor-transgenic CTLA-4-deficient mice*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1887-92.
92. Bachmann, M.F., et al., *Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered*. Eur J Immunol, 2001. **31**(2): p. 450-8.
93. Masteller, E.L., et al., *Structural analysis of CTLA-4 function in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5319-27.
94. Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison, *Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade*. Science, 1996. **271**(5256): p. 1734-6.
95. María Teresa Rugeles López, P.J.P.G., Carlos Julio Montoya Guarín, *Inmunología. Una ciencia activa*, 2009, Universidad de Antioquia.
96. Homet Moreno, B., et al., *Anti-PD-1 Therapy in Melanoma*. Semin Oncol, 2015. **42**(3): p. 466-473.

97. *BTLA B and T lymphocyte associated [ Homo sapiens (human) ] Gene ID: 151888*. 4-May-2015 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/151888>.
98. Beier, K.C., T. Kallinich, and E. Hamelmann, *Master switches of T-cell activation and differentiation*. Eur Respir J, 2007. **29**(4): p. 804-12.
99. Petersdorf, E.W., et al., *Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation*. N Engl J Med, 2001. **345**(25): p. 1794-800.
100. Kanda, Y., et al., *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000)*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1541-7.
101. Kanda, J., *Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2013. **98**(3): p. 300-8.
102. Shaw, B.E., et al., *The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2010. **150**(3): p. 251-8.
103. Gallardo, D., et al., *Hla-DPB1 mismatch in HLA-A-B-DRB1 identical sibling donor stem cell transplantation and acute graft-versus-host disease*. Transplantation, 2004. **77**(7): p. 1107-10.
104. Barrett, A.J., et al., *New developments in allotransplant immunology*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 350-71.
105. Rabinovich, G.A., *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina : un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica* 2004 Ed. Médica Panamericana.
106. Snell, G.D., *Methods for the study of histocompatibility genes*. J Genet, 1948. **49**(2): p. 87-108. Cited in Rabinovich GA. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la

- medicina : un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica, Ed. Médica Panamericana, 2004.
107. Snell, G.D., *The genetics of transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 1957. **69**(4): p. 555-60. Cited in Rabinovich GA. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina : un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica, Ed. Médica Panamericana, 2004.
108. Bailey, D.W., *H-2, a serendipitously encountered obstacle*. Int Rev Immunol, 1988. **3**(4): p. 305-12. Cited in Rabinovich GA. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina : un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica, Ed. Médica Panamericana, 2004.
109. Goulmy, E., *Human minor histocompatibility antigens*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 75-81.
110. Torikai, H., et al., *A novel HLA-A\*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human TMSB4Y gene*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 7046-54.
111. Spierings, E., *Minor histocompatibility antigens: past, present, and future*. Tissue Antigens, 2014. **84**(4): p. 374-60.
112. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p. 396-407.
113. Fontaine, P., et al., *Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 789-94.



114. Marijt, W.A., et al., *Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2742-7.
115. Kloosterboer, F.M., et al., *Direct cloning of leukemia-reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells*. Leukemia, 2004. **18**(4): p. 798-808.
116. Oostvogels, R., et al., *Identification of minor histocompatibility antigens based on the 1000 Genomes Project*. Haematologica, 2014. **99**(12): p. 1854-9.
117. Brochu, S., et al., *Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5104-14.
118. Burrows, S.R., et al., *T cell receptor repertoire for a viral epitope in humans is diversified by tolerance to a background major histocompatibility complex antigen*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1703-15.
119. Perreault, C., D.C. Roy, and C. Fortin, *Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones*. Immunol Today, 1998. **19**(2): p. 69-74.
120. Rufer, N., et al., *HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 910-6.
121. Pion, S., et al., *Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens*. Blood, 1999. **93**(3): p. 952-62.

122. den Haan, J.M., et al., *The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1054-7.
123. Klein, C.A., et al., *The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 359-68.
124. Torikai, H., et al., *The HLA-A\*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A\*0206*. Bone Marrow Transplant, 2007. **40**(2): p. 165-74.
125. Mommaas, B., et al., *Identification of a novel HLA-B60-restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3131-6.
126. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 281-5.
127. Gallardo, D., et al., *Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation*. Br J Haematol, 2001. **114**(4): p. 931-6.
128. Lin, M.T., et al., *Absence of statistically significant correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen-HA-1 and outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2001. **98**(10): p. 3172-3.
129. Tseng, L.H., et al., *Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2911-4.

130. Lio, H.Y., et al., *Minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 polymorphisms in Taiwan: frequency and application in hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Chem Lab Med, 2010. **48**(9): p. 1287-93.
131. den Haan, J.M., et al., *Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen*. Science, 1995. **268**(5216): p. 1476-80.
132. Pierce, R.A., et al., *The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3223-30.
133. Spierings, E., et al., *A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications*. PLoS One, 2006. **1**: p. e42.
134. Sellami, M.H., et al., *Mismatch for the minor histocompatibility antigen HA-2 and GVHD occurrence in HLA-A\*0201-positive Tunisian recipients of HSCs*. Immunol Invest, 2010. **39**(6): p. 611-20.
135. Brickner, A.G., et al., *The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 195-206.
136. Oostvogels, R., et al., *Towards effective and safe immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation: identification of hematopoietic-specific minor histocompatibility antigen UTA2-1*. Leukemia, 2013. **27**(3): p. 642-9.
137. Bosch-Vizcaya, A., et al., *Effect of mismatching for mHA UTA2-1 on clinical outcome after HLA-identical sibling donor allo-SCT*. Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(2): p. 298-300.

138. Popli, R., et al., *Clinical impact of H-Y alloimmunity*. Immunol Res, 2014. **58**(2-3): p. 249-58.
139. Spierings, E., et al., *Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(8): p. 1244-53.
140. Pawlak, E., et al., *The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(4): p. 336-41.
141. Jago, C.B., et al., *Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 463-71.
142. Liu, M.F., et al., *Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 2003. **57**(6): p. 568-72.
143. Sato, S., et al., *Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(10): p. 1261-6.
144. Oaks, M.K. and K.M. Hallett, *Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5015-8.
145. Perez-Garcia, A., et al., *Kinetics of the CTLA-4 isoforms expression after T-lymphocyte activation and role of the promoter polymorphisms on CTLA-4 gene transcription*. Hum Immunol, 2013. **74**(9): p. 1219-24.
146. Donner, H., et al., *CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 143-6.

147. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
148. Gonzalez-Escribano, M.F., et al., *CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis*. Tissue Antigens, 1999. **53**(3): p. 296-300.
149. Hudson, L.L., et al., *CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region*. Hum Genet, 2002. **111**(4-5): p. 452-5.
150. Perez-Garcia, A., et al., *CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors*. Blood, 2007. **110**(1): p. 461-7.
151. Anjos, S., et al., *A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46478-86.
152. Wang, X.B., et al., *A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein*. Genes Immun, 2002. **3**(4): p. 233-4.
153. Chen, Z., et al., *CTLA4 -1661A/G and 3'UTR long repeat polymorphisms are associated with ulcerative colitis and influence CTLA4 mRNA and protein expression*. Genes Immun, 2010. **11**(7): p. 573-83.
154. Dickinson, A.M., et al., *Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants*. Br J Haematol, 2004. **127**(5): p. 479-90.
155. Lin, M.T., et al., *Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation*. N Engl J Med, 2003. **349**(23): p. 2201-10.

156. © QIAGEN 2013–15. Available from:  
<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-mini-kit#productdetails>.
157. GE Healthcare; Instructions 71-7167-00 AG. Available from:  
[http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700AG\\_20110830221438.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc71716700AG_20110830221438.pdf).
158. © QIAGEN 2013–15; Repli-g Mini kit. Available from:  
<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/repli-g-mini-kit#productdetails>.
159. Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System. *Allelic Discrimination Getting Started Guide*.
160. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*. [cited 2015 23/07/2015]; Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>.
161. Torres, B., et al., *Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(7): p. 2211-5.
162. Perez-Garcia, A., et al., *CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 461-7.
163. Spierings, E., et al., *Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(6): p. e103.
164. Sellami, M.H., et al., *HA-1 and HA-2 minor histocompatibility antigens in Tunisians*. *Tissue Antigens*, 2010. **75**(6): p. 720-3.

165. Mutis, T., et al., *Graft-versus-host driven graft-versus-leukemia effect of minor histocompatibility antigen HA-1 in chronic myeloid leukemia patients*. *Leukemia*, 2010. **24**(7): p. 1388-92.
166. Oostvogels, R., H.M. Lokhorst, and T. Mutis, *Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives*. *Bone Marrow Transplant*, 2015.
167. van Lochem, E., et al., *Functional expression of minor histocompatibility antigens on human peripheral blood dendritic cells and epidermal Langerhans cells*. *Transpl Immunol*, 1996. **4**(2): p. 151-7.
168. Krenger, W. and J.L. Ferrara, *Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm*. *Immunol Res*, 1996. **15**(1): p. 50-73.
169. Hambach, L. and E. Goulmy, *Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(2): p. 202-10.
170. Ringden, O., et al., *Graft-versus-leukemia effect in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia is maintained using cyclosporin A combined with methotrexate as prophylaxis*. *Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 1996. **18**(5): p. 921-9.
171. Gratwohl, A., et al., *Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(12): p. 3877-86.
172. Lee, S.J., et al., *Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse*. *Blood*, 2002. **100**(2): p. 406-14.
173. Akatsuka, Y., et al., *Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling*. *Br J Haematol*, 2003. **123**(4): p. 671-5.

174. Perez-Garcia, A., et al., *Minor histocompatibility antigen HA-8 mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor allogeneic stem cell transplantation*. *Haematologica*, 2005. **90**(12): p. 1723-4.
175. Urbano-Ispizua, A., *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(2): p. 265-80.
176. Korbling, M. and P. Anderlini, *Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?* *Blood*, 2001. **98**(10): p. 2900-8.
177. Turpeinen, H., et al., *Minor histocompatibility antigens as determinants for graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. *Int J Immunogenet*, 2013. **40**(6): p. 495-501.
178. Zorn, E., et al., *Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation*. *J Exp Med*, 2004. **199**(8): p. 1133-42.
179. Hambach, L., E. Spierings, and E. Goulmy, *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(2): p. 171-87.
180. Hoppes, R., et al., *Altered peptide ligands revisited: vaccine design through chemically modified HLA-A2-restricted T cell epitopes*. *J Immunol*, 2014. **193**(10): p. 4803-13.
181. Petersdorf, E.W., et al., *High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(7): p. 599-609.
182. Breunis, W.B., et al., *Influence of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) common polymorphisms on outcome in treatment of melanoma patients with CTLA-4 blockade*. *J Immunother*, 2008. **31**(6): p. 586-90.



183. Perez-Garcia, A., et al., *CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy*. *Leukemia*, 2009. **23**(3): p. 486-91.
184. Martinez, C., et al., *Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts*. *Exp Hematol*, 1999. **27**(3): p. 561-8.
185. Scalapino, K.J. and D.I. Daikh, *CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease*. *Immunol Rev*, 2008. **223**: p. 143-55.
186. Chan, G.W., et al., *Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003. **9**(3): p. 170-6.
187. Collin, M.P., et al., *The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation*. *J Exp Med*, 2006. **203**(1): p. 27-33.



# Annex I

---

*“Tota informació és important si està connectada a una  
altra”*

*Umberto Eco*



**Taula annex 1:** Antígens menors d'histocompatibilitat autosòmics descrits fins al 2014, per ordre alfabètic

Nom	Restricció HLA	Gen	Cromosoma	Pèptid	dbSNP
ACC-1Y	HLA-A*24	BCL2A1	15	DYLQYVLQI	rs1138357
ACC-1C	HLA-A*24	BCL2A1	15	DYLQCVLQI	rs1138357
ACC-2	HLA-B*44	BCL2A1	15	KEFEDDIINW	rs3826007
ACC-4	HLA-A*31	CTSH	15	ATLPLLCAR	rs2289702
ACC-5	HLA-A*33	CTSH	15	WATLPLLCAR	rs2289702
ACC-6	HLA-B*44	HMSD	18	MEIFIEVFSHF	rs9945924
C19orf48	HLA-B*07	C19orf48	19	CIPPDSELLFPA	rs3745526
CD19	HLA-DQB1*02	CD19	16	WEGEPPCLP	rs2904880
DPH1	HLA-B*57	DPH1	17	SVLPEVDVW	rs35394823
HA-1/A2	HLA-A*02	HMHA1	19	VLHDDLLEA	rs1801284
HA-1/B60	HLA-B*40:01	HMHA1	19	KECVLHDDL	rs1801284
HA-2	HLA-A*02	MYO1G	7	YIGEVLSV	rs61739531
HA-3	HLA-A*01	AKAP13	15	VTEPGTAQY	rs2061821
HA-8	HLA-A*02	KIAA0020	9	RTLDKVLEV	rs2173904
HB-1H	HLA-B*44	HMHB1	5	EEKRGS�HVW	rs161557
HB-1Y	HLA-B*44	HMHB1	5	EEKRGSLYVW	rs161557
HEATR1	HLA-B*08	HEATR1	1	ISKERAEAL	rs2275687
HER2	HLA-A*02	HER-2/NEU	17	Not reported	rs1058808
LB-ADIR-1	HLA-A*02	TOR3A	1	SVAPALALFPA	rs2296377
LB-APOBEC3B-1K	HLA-B*07	APOBEC3B	22	KPQYHAEMCF	rs2076109
LB-ARHGDI1-1R	HLA-B*07	ARHGDI1	12	LPRACWREA	rs4703
LB-BCAT2-1R	HLA-B*07	BCAT2	19	QPRRALLFVIL	rs11548193
LB-EBI3-1I	HLA-B*07	EBI3	19	RPRARYYIQV	rs4740 48
LB-ECGF-1	HLA-B*07	TYMP	22	RPHAIRRPLAL	rs112723255
LB-ERAP1-1R	HLA-B*07	ERAP1	5	HPRQEIQIALLA	rs26653
LB-GEMIN4-1V	HLA-B*07	GEMIN4	17	FPALRFVEV	rs4968104
LB-LY75-1K	HLA-DRB1*13:01	LY75	2	GITYRNKSLM	rs12692566
LB-MR1-1R	HLA-DRB3*02:02	MR1	1	YFRLGVSDPIRG	rs2236410
LB-MTHFD1-1Q	HLA-DRB1*03:01	MTHFD1	14	SSIIADQIALKL	rs2236225
LB-NISCH-1A	HLA-A*02	NISCH	3	ALAPAPAEV	rs887515
LB-NUP133-1R	HLA-B*40:01	NUP133	1	SEDLILCRL	rs1065674
LB-PDCD11-1F	HLA-B*07	PDCD11	10	GPDSSKTFCL	rs2986014
LB-PI4K2B-1S	HLA-DQB1*06	PI4K2B	4	SRSSSAELDRSR	rs313549
LB-PRCP-1D	HLA-A*02	PRCP	11	FMWDVAEDLKA	rs386564200
LB-PTK2B-1T	HLA-DRB3*01:01	PTK2B	8	VYMNDTSPL	rs751019
LB-SON-1R	HLA-B*40:01	SON	21	SETKQRTVL	rs13047599
LB-SSR1-1S	HLA-A*02	SSR1	6	SLAVAQDLT	rs10004
LB-SWAP70-1Q	HLA-B*40:01	SWAP70	11	MEQLEQLEL	rs415895
LB-TRIP10-1EPC	HLA-B*40:01	TRIP10	19	GEPQDLCTL	rs1049229 <sup>b</sup>
LB-WNK1-1I	HLA-A*02	WNK1	12	RTLSPEITV	rs12828016
LRH-1	HLA-B*07	P2X5	17	TPNQQRQNV	rs3215407
P2RX7	HLA-A*29	P2RX7	12	WFHHCHPKY	rs7958311
PANE1	HLA-A*03	CENPM	22	RVWDLPGVLK	rs5758511
SLC19A1	HLA-DRB1*15:01	SLC19A1	21	RLVCYLCFY	rs1051266
SLC1A5	HLA-B*40:02	SLC1A5	19	AEATANGGLAL	rs3027956
SP110	HLA-A*03	SP110	2	SLPRGTSTPK	rs1365776
T4A	HLA-A*02	TRIM42	3	GLYTYWSAGA	rs9876490
TRIM22	HLA-A*02	TRIM22	11	MAVPPCCIGV	rs187416296
UGT2B17	HLA-A*02	UGT2B17	4	CVATMIFMI	n.a.
UGT2B17	HLA-A*29	UGT2B17	4	AELLNIPVLY	n.a.
UGT2B17	HLA-B*44	UGT2B17	4	AELLNIPVLY	n.a.
UTA2-1	HLA-A*02	KIAA1551	12	QLLNSVLT	rs2166807
UTDP4	HLA-DPB1*04	ZDHHC12	9	RILAHFFCGW	rs11539209
ZAPHIR	HLA-B*07	ZNF419	19	IPRDSWWVEL	rs2074071

n.a: no té número d'identificació dbSNP assignat / dbSNP: de l'anglès "single nucleotide polymorphism database"

b: L'AcmH LB-TRIP10-1EPC conté els següents SNPs: rs1049229, rs1049230 i rs1049232

---

**Taula annex 2:** Hospitals membres del Grup Espanyol de Transplantament Hematopoetic (GETH)
 

---

Hospital Duran i Reynals. Barcelona  
 Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
 Hospital Clínic Universitari. Valencia  
 Hospital Reina Sofía. Córdoba  
 Hospital la princesa. Madrid  
 Hospital Clínic i Provincial. Barcelona  
 Hospital Gregorio Marañón. Madrid  
 Complex hospitalari Salamanca  
 Hospital de Murcia  
 Hospital Nuestra Señora de Aranzazu- Donosti  
 Hospital Marqués de Valdecilla- Santander  
 Hospital Carlos Haya-Málaga  
 Hospital general Dr. Negrín- Gran Canaria  
 Hospital la Fe- Valencia  
 Hospital central de Asturias  
 Vall d'hebron-Barcelona  
 Son Dureta- Palma  
 Hospital Ramón y Cajal, Madrid  
 Hospital Virgen del Rocío. Sevilla  
 Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona  
 Clínica Puerta del Hierro- Madrid  
 Hospital Virgen de la Arrixaca

---

**Taula annex 3:** Variacions del protocol proposat per *Spierings* i col·laboradors

Protocol proposat per <i>Spierings</i> i col.	Protocol utilitzat AgsmH I HGH2
80 ng genomic DNA	100 ng genomic DNA
0.25 U <i>Amplitaq</i> ( <i>Perkin-Elmer, Norwalk, CT</i> )	1.25 U <i>Taq</i> DNA Polymerase
0.01% gelatin	<del>0.01% gelatin</del>
0.8 mM dNTP	0.2 mM de cada dNTP
0.5 mM encebadors específics/AgmH	0.25 µM encebadors específics/AgmH
0.125 mM encebadors HPA	0,10 µM encebadors <b>HGH2</b>
0.125 mM encebadors HLA-DR	
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM Mg <sup>2+</sup>
50 mM KCl	50 mM KCl
10 mM bTris HCl (pH 8.3)	30 mM Tris HCl
6% sucrose	<del>6% sucrose</del>
1 mM cresol red	<del>1 mM cresol red</del>
<del>0.2% Igepal®-CA630</del>	0.1% Igepal®-CA630

---

**Taula annex 4:** Encebadors i sondes utilitzats per a l'amplificació o detecció dels polimorfismes objecte d'estudi

<b>ESTUDI ANTÍGENS MENORS D'HISTOCOMPATIBILITAT</b>				
<b>Mètode</b>	<b>Fragment amplificat</b>	<b>Mida fragment (pb)</b>	<b>Encebador sentit</b>	<b>Encebador antisentit</b>
PCR-SSP	HGH2	504	5'HGH2-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	3'HGH2-ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC
	HA-1H	190	5'HA-1H- CTTAAGGAGTGTGTGCTGCA	3'HA-1- ACTCCTACACATCCCTCAGA
	HA-1R	190	5'HA-1R -CTTAAGGAGTGTGTGTTGCG	3'HA-1- ACTCCTACACATCCCTCAGA
	HA-2V	271	5'HA-2 -ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG	3'HA-2V- GCTCCTGGTAGGGGTTCA
	HA-2M	271	5'HA-2 -ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG	3'HA-2M- GCTCCTGGTAGGGGTTCA
	HA-8R	187	5'HA-8R- TGCAGTCAGCAGATCACCG	3'HA-8- CTTCTGGGCAACAGTTATGGA
	HA-8P	187	5'HA-8P -TGCAGTCAGCAGATCACCG	3'HA-8- CTTCTGGGCAACAGTTATGGA
	Seqüenciació	UTA2-1	725	5'UTA2-1-CGTATGGTTGAACTACCAATGAG
Discriminació al·lèlica	Sonda HA-1		<b>Sonda</b> GAGAACTTAAGGAGTGTGTGTTGC[A/G]TGACGGTGAGAGCCACGGGGACACC	
	Sonda HA-8		TACCTCTAACACTTTGTCCAGAGTT[C/G]GGTGATCTGCTGACTGCAACAAAAC	
	Sonda UTA2-1		TTGCAAGTAAAAATAGTCAGCTTC[C/T]AAATTCTGTATTAACCTTACCATCA	
<b>ESTUDI CTLA-4</b>				
<b>Mètode</b>	<b>Fragment amplificat</b>	<b>Mida fragment (pb)</b>	<b>Encebador sentit</b>	<b>Encebador antisentit</b>
PCR	CT60	216	5'CT60- CAC CAC TAT TTG GGA TAT ACC	3'CT60- AGG TCT ATA TTT CAG GAA GGC
	+49	674	5' +49- GTC AAG GGA CCA TTA GAA G	3'+49- CTT TGC AGA AGA CAG GGA TGA A
Discriminació al·lèlica	Sonda CT60		<b>Sonda</b> TCTTCACCACTATTTGGGATATAAC[A/G]TGGGTAAACACAGACATAGCAGTCC	
	Sonda +49		GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT	

**Taula annex 5:** Concentracions i condicions de PCR-SSP utilitzats per a l'estudi mHAgS

Fragment d'estudi	Encebadors utilitzats	Concentracions dels components de reacció	Condicions termociclador
HA-1H	5'HA-1H 3'HA-1 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 30 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 30 seg; 60°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
HA-1R	5'HA-1R 3'HA-1 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 30 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 30 seg; 60°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
HA-2V	5'HA-2 3'HA-2 V 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 10 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 10 seg; 61°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
HA-2M	5'HA-2 3'HA-2 M 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 10 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 10 seg; 61°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
HA-8R	5'HA-8R 3'HA-8 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 10 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 10 seg; 58.8°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
HA-8P	5'HA-8P 3'HA-8 5'HGH2 3'HGH2	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.1% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 100 ng DNA, 0.25 µM de cada encebador específic, 0,10 µM dels encebadors HGH2. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 10 seg; 64°C x 1 min) x 10 cicles; (94°C x 10 seg; 58.8°C x 50 seg; 72°C x 30 seg ) x 20 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞



**Taula annex 6:** Concentracions i condicions de Discriminació al·lèlica mitjançant PCR a temps real

Polimorfismes analitzats	Concentracions finals dels components de reacció	Condicions termociclador
mHAgS: HA-1, HA-8, UTA2-1 CTLA-4: CT60, +49	TaqMan Genotyping Master Mix 1X; Genotyping assay 1X; DNA entre 1-10ng. Volum final: 25µL	<u>60°C x 1 min</u> ; 50°C x 2 min; 95°C x 10 min; (95°C x 15 seg; 60°C x 1 min) x 40 cicles; <u>60°C x 1 min</u>

Les temperatures i temps subratllats corresponen a les lectures de fluorescència basal i final, respectivament

**Taula annex 7:** Concentracions, condicions i protocol utilitzat per a la seqüenciació automàtica en electroforesi capil·lar

Pas	Concentració dels components de reacció	Condicions de termociclador
PCR Encebadors utilitzats: 5'UTA2-1 3'UTA2-1	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.2% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 75-100 ng DNA, 0.50 µM de cada encebador. Volum final: 25 µL	94°C x 2 min; (94°C x 1 min; 56°C x 1 min; 72°C x 1 min) x 35 cicles; 72° x 10 min; 4° ∞
Purificació mitjançant incubació	Proporció 2.5 producte amplificat : 1 EXOSAP	37°C x 15min; 85°C x 15 min; 4°C ∞
Marcatge dels fragments	1X <i>Tampó BigDye</i> , 0.25X <i>BigDye</i> , 5pM encebador, 20ng DNA	96°C x 1min; (96°Cx 1 seg; 50°C x 5 seg; 60°C x 4 min) x 25 cicles; 4°C ∞

**Taula annex 8:** Concentracions i condicions de PCR i digestió per a l'estudi dels polimorfismes de CTLA-4

Amplificació fragment			
SNP	Encebadors	Concentració dels components de reacció	Condicions de termociclador
CT60	5'CT60 3'CT60	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.2% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 75-100 ng DNA, 0.625µM de cada encebador. Volum final: 20µL	94 °C x 5 min; (94 °C x 30 seg; 60 °C x 30 seg; 72°C x 1 min) x 30 cicles; 72 °C x 10 min.
+49	5'+49 3'+49	1.25U Taq, 50 mM KCl, 30mM Tris-HCl, 1.5mM Mg <sup>2+</sup> , 0.2% Igepal®-CA630, 200µM de cada dNTP, 75-100 ng DNA, 0.625µM de cada encebador. Volum final: 20µL	94 °C x 5 min; (94 °C x 45 seg; 56 °C x 45 seg; 72°C x 1 min) x 35 cicles; 72 °C x, 10 min ; 4°C x ∞
Digestió fragments			
SNP	Enzim de restricció	Concentració dels components de reacció	Condicions de termociclador
CT60	NcoI	1x Buffer 4, 1 U Nco I, 3µl PCR. Volum final 10µl	3 h a 37 °C
+49	BbvI	1x Buffer 2, 1 U Bbv I, 3 µl PCR. Volum final 10µl	2 h a 37 °C







# Annex II

---

*“Només existeixen dues normes per escriure: tenir algo a  
dir i dir-ho”*

*Oscar Wilde*





Published version cannot be used

Bosch-Vizcaya A, Rodriguez-Romanos R, Nieto JB, de la Cámara R, Brunet S, Vallejo C, Osca-Gelis G, Martínez-Laperche C, Buño I, Urbano-Ispizúa Á, González M, Jiménez-Velasco A, Gallardo D. Effect of mismatching for mHA UTA2-1 on clinical outcome after HLA-identical sibling donor allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Feb;50(2):298-300. doi: 10.1038/bmt.2014.234. Epub 2014 Oct 20.

<http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2014.234>

<http://www.nature.com/bmt/journal/v50/n2/full/bmt2014234a.html>

published online 20 October 2014

© 2015 Macmillan Publishers Limited

### **Abstract**

The appearance of GVHD and the relapse of the neoplastic disease are still the main complications after allo hematopoietic SCT (allo-HSCT). Immunotherapy with donor T-lymphocyte infusion is an effective method for treating relapse after allo-HSCT, but the therapeutic graft versus tumor (GVT) effect is often associated with the appearance of acute GVHD1. Many strategies have been developed to separate both effects, mainly by targeting tumor-associated proteins or by exploiting the presence of donor-recipient immunogenetic mismatches.







## Donor CTLA-4 Genotype Influences Clinical Outcome after T Cell-Depleted Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Identical Sibling Donors

Anna Bosch-Vizcaya,<sup>1</sup> Arianne Pérez-García,<sup>2</sup> Salut Brunet,<sup>3</sup> Carlos Solano,<sup>4</sup> Ismael Buño,<sup>5</sup> Vicent Guillem,<sup>4</sup> Carolina Martínez-Laperche,<sup>5</sup> Guillermo Sanz,<sup>6</sup> Cristina Barrenetxea,<sup>7</sup> Carmen Martínez,<sup>8</sup> Esperanza Tuset,<sup>1</sup> Natàlia Lloveras,<sup>1</sup> Rosa Coll,<sup>1</sup> Ramon Guardia,<sup>1</sup> Yolanda González,<sup>1</sup> Josep M. Roncero,<sup>1</sup> Anna Bustins,<sup>1</sup> Santiago Gardella,<sup>1</sup> Cristalina Fernández,<sup>1</sup> Joan Buch,<sup>1</sup> David Gallardo,<sup>1</sup> on behalf of the GvHD/Immunotherapy committee of the Spanish Group for Hematopoietic Transplant (GETH)

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) plays a pivotal role in inhibiting T cell activation through competitive interaction with B7 molecules and interruption of costimulatory signals mediated by CD28. Polymorphisms on the *CTLA-4* gene have been previously associated with autoimmune diseases, predisposition to leukemic relapse, and with graft-versus-host disease (GVHD) or relapse after allogeneic transplant. As CTLA-4 is expressed on T-lymphocytes, the aim of this study was to determine whether the donor CTLA-4 CT60 genotype also influences clinical outcome even after T cell depletion with CD34-positive selection. We studied 136 patient-donor pairs. Overall survival (OS) was worse for those patients who received grafts from a donor with the CT60 AA genotype rather than from a donor with the AG or GG genotype (35.6% vs 49.4%;  $P = .043$ ). This association was confirmed through multivariate analysis, which identified the donor CT60 genotype as an independent risk factor for OS ( $P = .008$ ; hazard ratio [HR]: 2.24, 95% confidence interval [CI]: 1.23-4.08). The donor CT60 AA genotype was also associated with lower disease-free survival, this being related to an increased risk of relapse ( $P = .001$ ; HR: 3.41, 95% CI: 1.67-6.96) and a trend toward higher transplant-related mortality. These associations were stronger when considering only patients in the early stage of disease. Our results suggest that graft-versus-leukemia (GVL) activity after T cell depletion is conditioned by the donor CTLA-4 genotype.

*Biol Blood Marrow Transplant* 18: 100-105 (2012) © 2012 American Society for Blood and Marrow Transplantation

**KEY WORDS:** CTLA-4, CD34-positive selection, Relapse

From the <sup>1</sup>Servei d'hematologia, Institut Català d'Oncologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; <sup>2</sup>Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York, New York, USA; <sup>3</sup>Servei d'hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Servicio de hematología, Hospital Clínico, Valencia, Spain; <sup>5</sup>Servicio de hematología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Servicio de Hematología, Hospital La Fé, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Servei d'hematologia, Hospital Vall d'Hebró, Barcelona, Spain; and <sup>8</sup>Servei d'hematologia, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

*Financial disclosure:* See Acknowledgments on page 104.

Correspondence and reprint requests: David Gallardo, MD, PhD, Clinical Hematology Department, Institut Català d'Oncologia, Hospital Josep Trueta, Avda. França s/n, 17007 Girona, Spain (e-mail: dgallardo@iconcologia.net).

Received April 15, 2011; accepted May 23, 2011

© 2012 American Society for Blood and Marrow Transplantation  
1083-8791/\$36.00

doi:10.1016/j.bbmt.2011.05.021

### INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the treatment of choice for many haematologic malignancies. However, disease relapse and graft-versus-host disease (GVHD) remain significant concerns after allo-HSCT [1].

Donor T-lymphocytes play a critical role in alloimmune recognition, leading to GVHD but also contributing to relapse prevention through recognition and subsequent elimination of minimal residual disease [2,3]. Although T cell depletion of the graft is associated with a lower GVHD incidence, this benefit is impaired by an increased relapse rate [3-5].

The cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) is a homologous molecule of CD28 that modulates T cell activation. CTLA-4 has greater affinity for B7 than does CD28, and its translocation to the cell surface after T cell activation results in a negative signal, which is responsible for T cell inactivation [6,7].

The human *CTLA-4* gene is located on 2q33. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described within the *CTLA-4* gene [8]. One of these SNPs, CT60, is located in the 3'-untranslated region of the gene. Clinically, the CT60 G allele has been reported to increase susceptibility to several autoimmune diseases [8-11], and it has also been related with less leukemic relapse after obtaining complete remission with standard chemotherapy [12], suggesting that the CT60 AG/GG genotype is associated with an increased immunologic response. By contrast, the same genotype has been associated with a lower incidence of GVHD after allogeneic transplantation [13]. It has been described that the G allele of CT60 produces less soluble isoform of CTLA-4 (sCTLA4) mRNA than does the A allele, and it has also been hypothesized that sCTLA-4 blocks the B7-full-length CTLA-4 interaction, thereby enhancing T cell reactivity by preventing the transduction of inhibitory signals that lead to lymphocyte inactivation expression [9].

All these studies are focused on the ability of T-lymphocytes to maintain an autoimmune or alloimmune response after antigen recognition. However, there are no studies regarding the effect of CTLA-4 polymorphisms on alloimmune recognition when the allo-HSCT is performed with exhaustive T cell depletion through CD34-positive selection (allo-HSCT-CD34). As CTLA-4 is expressed on the donor T-lymphocytes, it is not known whether the CTLA-4 genotype may still be important in terms of modulating of the immune responses that will depend on the newly generated T cells from the infused stem cells.

The present study aims to determine whether the CT60 genotype of the donor influences the clinical outcome of patients receiving an allo-HSCT-CD34 from an HLA-identical sibling donor.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

We analyzed 136 patients who received an allogeneic stem cell transplant from an HLA-identical sibling in Spanish transplant centers between 1996 and 2007. Peripheral blood was the source of stem cells, and the graft was T cell depleted by positive selection of CD34 cells in all cases. Patients were all older than 15 years, and the conditioning regimen was always myeloablative. Written informed consent was obtained from patients and donors before DNA storage. Table 1 summarizes the clinical characteristics of the patients included in this study.

### CTLA-4 CT60 Genotyping

DNA samples were obtained from donor's peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini

**Table 1. Clinical Characteristics of the Analyzed Cohort**

Patient age:	Median: 40 years (range: 17-59).
Patient gender:	Male: 75 (55.1%); female: 61 (44.9%).
Diagnosis:	AML: 63 (46.3%); CML: 24 (17.6%); ALL: 16 (11.8%); NHL: 14 (10.3%); MDS: 9 (6.6%); MM: 8 (5.9%); SAA: 1 (0.7%); HD: 1 (0.7%).
Disease status:	Early stage: 94 (69.1%); advanced disease: 33 (24.3%); missing data: 9 (6.6%).
Donor age:	Median: 41 years (range: 15-64).
Gender mismatch:	Male recipient and female donor: 29 (21.3%)
Stem cell source:	Peripheral blood: 136 (100%)
Conditioning regimen:	Cy-TBI: 81 (59.6%); BuCy: 28 (20.6%); BuCy + thiotepea: 9 (6.6%); Cy-TBI-Etoposide: 5 (3.7%); other: 13 (9.5%)
CD34 selection:	Yes: 136 (100%)
GVHD prophylaxis:	CSA alone: 81 (59.5%); CSA + MTX: 17 (12.5%); CSA + PDR: 30 (22.1%); other: 8 (5.9%).

AML indicates acute myelogenous leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; NHL, non-Hodgkin lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; SAA, severe aplastic anemia; HD, Hodgkin's disease; Cy-TBI, cyclophosphamide + total body irradiation; BuCy, busulphan-cyclophosphamide; CSA, cyclosporine A; MTX, methotrexate; PDR, prednisone. Advanced disease was considered for patients with acute leukemia beyond the first complete remission. CML beyond the first chronic phase, and progressive disease for patients with MDS, MM, or lymphoma.

Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Genotyping of the CTLA-4 CT60 polymorphism was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) as previously described [13].

### Statistical Analysis

The analysis was performed according to the presence or absence of the G allele on the CT60 polymorphism, with 2 groups being created: patients receiving a graft from a donor with the CT60 AA genotype were compared with those whose donor was homozygous for the G allele or heterozygous A/G. Homogeneity between groups was assessed by means of the chi-square test for categorical variables and the *t* test for continuous variables. A 2-sided *P* value of .05 or lower was considered statistically significant. Kaplan-Meier curves were derived to determine overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), and curves were compared by means of the log-rank test. Cumulative incidence estimates were used to explore differences in acute GVHD (aGVHD), transplant-related mortality (TRM) and relapse incidence. Death without signs of GVHD was considered as a competitive risk for aGVHD. The competing risk for relapse was death in complete remission (CR).

Multivariate analysis was performed using the Cox regression model. All the variables with a *P* value at or below .2 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.



**Table 2. Homogeneity of the Study Groups**

Genotype	CT60 AG/GG	CT60 AA	P value
No. of patients	106 (77.9%)	30 (22.1%)	
Median age	39.5	44.7	.019
Gender			
Male	56 (52.8%)	19 (63.3%)	
Female	50 (47.2%)	11 (36.7%)	.307
Diagnosis			
Acute leukemia/MDS	70 (66.7%)	17 (56.7%)	
Other	35 (33.3%)	13 (43.3%)	.313
Disease stage			
Early	71 (71.7%)	23 (82.1%)	
Advanced	28 (28.3%)	5 (17.9%)	.267
Gender mismatch	21 (19.8%)	8 (26.7%)	.418
Sensitized donor	18 (22.0%)	10 (40.0%)	.072
Conditioning regimen with TBI	69 (66.3%)	21 (70.0%)	.707
Prophylaxis			
CSA	62 (58.5%)	18 (60%)	
CSA + MTX	11 (10.4%)	6 (20%)	
CSA + corticosteroids	25 (23.5%)	5 (16.7%)	
Other	2 (1.9%)	0 (0%)	
Missing data	6 (5.7%)	1 (3.3%)	.598
Donor CMV <sup>+</sup>	74 (77.9%)	23 (88.5%)	.231
Patient CMV <sup>+</sup>	74 (75.5%)	24 (85.7%)	.252

MDS indicates myelodysplastic syndrome; TBI, total body irradiation; CSA, cyclosporine A; MTX, methotrexate; CMV, cytomegalovirus. Comparison between the patients whose donor had a CTLA-4 CT60 AG/GG genotype and those transplanted from a donor with CT60 AA genotype. Gender mismatch was considered when the donor was female and the recipient male. Sensitized donors correspond to donors with previous pregnancies or transfusions. Patient/donor CMV<sup>+</sup> indicates positive IgG cytomegalovirus serology.

## RESULTS

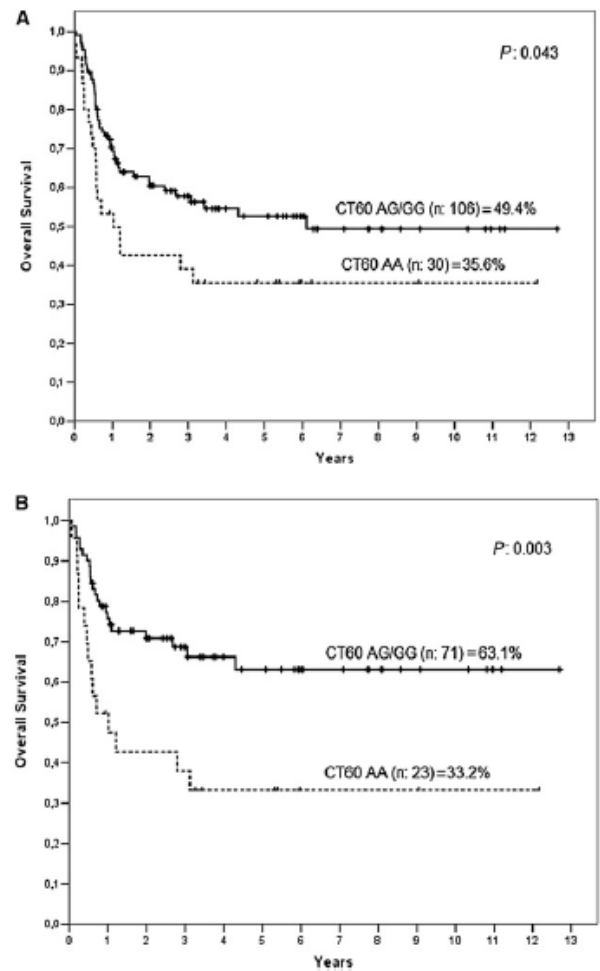
### CT60 Genotyping

Genotyping showed that 106 donors were CT60 AG/GG and 30 were CT60 AA. The distribution of genotypes was similar to that previously described in Caucasian populations [13]. Table 2 shows the comparison between these 2 groups. The groups were comparable when considering the clinical characteristics, the only exception being that patients with the AA genotype had a higher median age (39.5 vs 44.7 years,  $P = .019$ ).

### OS

The OS rate at 12 years was better for those patients who received cells from a donor with the CT60 AG/GG genotype (49.4%) rather than from a CT60 AA donor (35.6%), the difference being statistically significant ( $P = .043$ ) (Figure 1A). Median survival was 6.1 years for patients receiving grafts from CT60 AG/GG donors and 1 year for patients transplanted from CT60 AA donors.

This difference in OS according to donor genotype became more evident when analyzing only patients transplanted in the early stage of the underlying hematologic malignancy (defined as first CR [CR1] for acute leukemia, first chronic phase [CP1] for chronic myeloid leukemia (CML), or at least stable disease



**Figure 1.** Overall survival rate after allo-HSCT-CD34 and its relationship to CT60 genotypes. Association between the CT60 genotype and OS in the whole cohort (A) and in patients transplanted in the early stage (B).

for the rest of the hematologic malignancies): 63.1% versus 33.2%,  $P = .003$  (Figure 1B).

We analyzed a more homogeneous group defined by the diagnosis, looking at the OS for patients with acute myelogenous leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL), and myelodysplastic syndromes (MDS), which represent currently the main indications for allogeneic transplantation. We found that OS was still better for those patients transplanted from a donor with the CT60 AG/GG genotype ( $n = 70$ ) compared with those whose donor was homozygous for the A allele ( $n = 17$ ): 49.4% versus 26.5% reaching a trend to the statistical significance ( $P = .068$ ), which was confirmed when considering only patients transplanted in early stage (68.3% vs 26.9%;  $P = .009$ ).

Multivariate analysis confirmed that the donor CT60 genotype was an independent risk factor for overall survival ( $P = .008$ ; HR = 2.24, 95% CI = 1.23-4.08), together with advanced disease stage at transplant ( $P = .001$ ; HR = 2.63, 95% CI = 1.50-4.62) and the use of total body irradiation (TBI) as

**Table 3. Multivariate Analysis and Clinical allo-HSCT-CD34 Outcome**

Variables	P value	HR (95% CI)
<b>Overall survival</b>		
Donor CTLA4 AA genotype	.008	2.24 (1.23-4.08)
Advanced disease	.001	2.63 (1.50-4.62)
Total body irradiation	.035	1.84 (1.04-3.25)
Gender	.330	—
Diagnosis	.189	—
Age of patient	.320	—
Sensitized donor	.528	—
<b>Disease-free survival</b>		
Donor CTLA4 AA genotype	<.001	2.94 (1.67-5.18)
Advanced disease	<.001	3.34 (1.92-5.80)
Age of donor	.279	—
Prophylaxis	.665	—
Sensitized donor	.061	—
<b>Relapse incidence</b>		
Donor CTLA4 AA genotype	.001	3.41 (1.67-6.96)
Disease stage	<.001	4.88 (2.45-9.71)
Age of donor	.240	—
Prophylaxis	.395	—
Sensitized donor	.126	—

HR indicates hazard ratio; CI, confidence interval; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

part of the conditioning regimen ( $P = .035$ ; HR = 1.84, 95% CI = 1.04-3.25) (Table 3).

### DFS

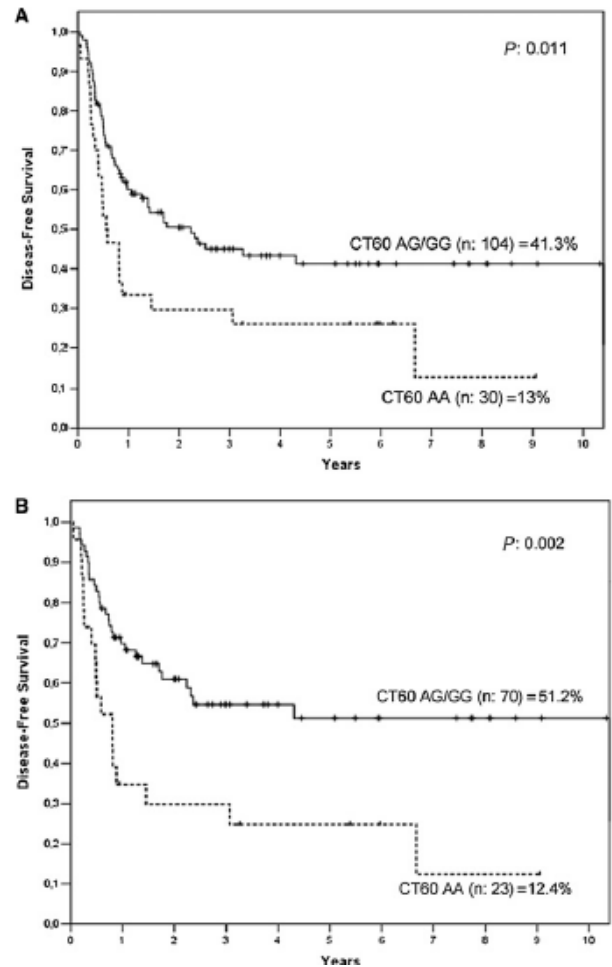
The DFS rate was also influenced by the donor CTLA-4 CT60 genotype: patients receiving grafts from a donor with the CT60 AG/GG genotype had better DFS than did those whose donor was CT60 AA (41.3% vs 13%,  $P = .011$ ) (Figure 2A). This difference in DFS was also detected when analyzing only patients in the early stage of the underlying hematologic malignancy (51.2% vs 12.4%,  $P = .002$ ) (Figure 2B).

When analyzing only patients with acute leukemia or MDS, DFS was also better for patients transplanted from donors with the AG/GG CT60 genotype (45.1% vs 14.1%;  $P = .052$ ), especially when considering only patients transplanted in an early stage of their disease (59.8% vs 14.4%;  $P = .016$ ).

The association between the donor CT60 AA genotype and worse DFS was confirmed by multivariate analysis ( $P < .001$ ; HR = 2.94, 95% CI = 1.67-5.18), which also revealed the disease stage as a relevant risk factor ( $P < 0.001$ ; HR = 3.34, 95% CI: 1.92-5.80) (Table 3).

### Relapse Incidence

The univariate analysis considering competitive risks found no statistically significant difference in the relapse incidence between patients according to whether grafts were received from a donor with the CT60 AG/GG or AA genotypes (42.3% vs 57%, respectively,  $P = .320$ ). However, when considering only patients transplanted in the early stage of their disease, a trend toward a statistically significant higher



**Figure 2.** Disease-free survival rate after allo-HSCT-CD34 and its relationship to CT60 genotypes. Association between the CT60 genotype and DFS in the whole cohort (A) and in patients transplanted in the early stage (B).

relapse incidence was observed for patients whose donor was genotyped as CT60 AA (31.8% for genotypes AG/GG vs 57.1% when the donor was homozygous for the A allele,  $P = .052$ ). Multivariate analysis identified the CTLA-4 CT60 genotype of the donor as an independent risk factor for relapse ( $P = .001$ ; HR = 3.41, 95% CI = 1.67-6.96), together with the disease stage at transplant ( $P < .001$ ; HR = 4.88, 95% CI = 2.45-9.71) (Table 3).

We did not observe any effect of the CTLA-4 CT60 G allelic dose neither in OS nor in DFS, obtaining similar results for those patients transplanted from a donor with CT60 genotype AG or GG.

### TRM

There was also a trend toward statistical significance when considering the differences in TRM between patients according to whether the donor was CT60 AG/GG or CT60 AA (17.4% vs 30%;  $P = .104$ ). However, the multivariate analysis



failed to obtain statistically significant differences ( $P = .146$ ).

### GVHD

No differences were detected regarding the incidence of either grades II-IV aGVHD (21.8% vs 20%,  $P = NS$ ) or grades III-IV aGVHD (8.2% vs 6.6%,  $P = NS$ ). The incidence of extensive chronic GVHD (cGVHD) was also similar in the 2 groups (11.6% vs 12.5%,  $P = NS$ ).

### DISCUSSION

We have previously described how CTLA-4 gene polymorphisms are involved in the immune response following allo-HSCT from an HLA-identical sibling donor, as well as in the immune surveillance that leads to a lower relapse incidence after obtaining complete remission in acute leukemia [12,13]. However, there are no clinical observations concerning the role of CTLA-4 after allo-HSCT-CD34. As donor T-lymphocytes are removed from the graft, immunologic responses, including recognition of the minimal residual disease, have to be mediated by the newly generated T cells from the graft. This T cell repopulation is usually delayed after positive CD34 selection [14], and one question to be answered is whether the CTLA-4 genotype of these newly generated T-lymphocytes remains relevant for the clinical outcome.

The present study has identified the CTLA-4 CT60 AA genotype of the donor as an independent risk factor for worse OS after allo-HSCT-CD34. This finding is associated with an increased risk of relapse, suggesting that CTLA-4 also plays an important role in modulating the recognition of minimal residual disease, even when T-lymphocytes are generated from the infused CD34 cells. In other words, T cell depletion impairs the graft-versus-leukemia (GVL) effect, as previously reported, but the CTLA-4 genotype of the donor appears to distinguish 2 cohorts of patients: those whose donor had the CT60 AG/GG genotype would benefit from a certain GVL effect, whereas those whose donor was CT60 AA would not. However, we must consider that most of our patients received cyclosporine, which dampens T cell function, and perhaps our observations may not apply to CD34 selection strategies where no additional GVHD prophylaxis is given.

Interestingly, the donor CT60 genotype produced no differences in either the aGVHD or cGVHD incidence in our patients. In the case of aGVHD, this is probably because of the almost complete absence of donor T-lymphocytes during the first months after infusion. A more relevant finding is the association of CT60 AG/GG with a lower relapse incidence but without developing more cGVHD, suggesting a separation between the GVHD and GVL effects in these patients.

It is worth noting that the observed association between the donor CTLA-4 CT60 AG/GG genotype and both lower relapse incidence and better survival is consistent with previous studies that show a higher incidence of autoimmune diseases in people carrying this genotype [9], as well as with the lower relapse rate observed for acute leukemia patients with the CT60 AG/GG genotype after achieving complete remission with standard induction chemotherapy [12]. Taken together, these observations suggest a lower CTLA-4 inhibitory response of T cell activation, leading to enhanced immune surveillance in the presence of at least 1 CT60 G allele. Surprisingly, this CT60 genotype has been related not only with less aGVHD but also with a higher relapse rate and worse survival after allo-HSCT from an HLA-identical sibling performed with a myeloablative conditioning regimen and without T cell depletion [13]. The hypothesized mechanism underlying this differential behavior in the allogeneic setting was that the lower production of the CTLA-4 soluble isoform observed in the presence of the CT60 AG/GG genotype could be important in modulating the immune response to allogeneic peptides, such as minor histocompatibility antigens. However, the present results provide new data concerning the role of CTLA-4 after allogeneic transplantation, suggesting that the T-lymphocyte response is different when these cells are infused together with the graft, as opposed to being newly generated from the pluripotent stem cell. One possible explanation for this observation could be that the T-lymphocyte repopulation after allogeneic stem cell transplantation with positive selection of CD34 cells is often delayed beyond 3 months after transplantation [14], when the tissue-associated antigen-presenting cells (APCs) have already been replaced and become of donor origin [15,16]. As a consequence of this change, these APCs would not present peptides proceeding from endogenous proteins of the recipient, such as minor histocompatibility antigens, thereby leading to an immunologic scenario similar to the autologous setting.

We conclude that the CTLA-4 genotype influences immunological responses after allo-SCT from HLA-identical sibling donors, even after exhaustive T cell depletion.

### ACKNOWLEDGMENTS

*Financial disclosure:* This work has been partially financed by grant FIS080413 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Spanish Ministry of Health, and by a grant from the Mutua Madrileña. The authors are also grateful for the financial support given by the association "Llavaneres contra el cancer."

## REFERENCES

- Holler E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: GvHD prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:281-294.
- Weiden PL, Flourmoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979;300:1068-1073.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555-562.
- Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med.* 1988;108:806-814.
- André-Schmutz I, Dal Cortivo L, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Improving immune reconstitution while preventing GvHD in allogeneic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2005;7:102-108.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-548.
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:336-347.
- Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA-4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Grave's disease and to type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol.* 1997;82:143-146.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;423:506-511.
- Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, Garcia A, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA-4 polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 1999;53:296-300.
- Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet.* 2002;111:452-455.
- Pérez-García A, Brunet S, Berlanga JJ, et al. CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy. *Leukemia.* 2009;23:486-491.
- Pérez-García A, De la Cámara R, Román-Gómez J, et al. CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood.* 2007;110:461-467.
- Martínez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, et al. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. *Exp Hematol.* 1999;27:561-568.
- Collin MP, Hart DN, Jackson GH, et al. The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med.* 2006;203:27-33.
- Chan GW, Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:170-176.







David Gallardo, Anna Bosch-Vizcaya, Rocío Rodríguez-Romanos, Nazly Santos, Ismael Buño, Rafael de la Cámara, Salut Brunet, Antonio Jiménez-Velasco, Marcos González, Jose B. Nieto, Carolina Martínez-Laperche, Carlos Vallejo, Christelle Ferrá, Antònia Sampol, Javier López-Jiménez, José A. Pérez-Simón, Carmen Martínez, José L. Díez, on behalf of the GvHD/Immunotherapy Committee of the Spanish Hematopoietic Transplant Group (GETH). CTLA-4 genotype and immune responses to minor histocompatibility antigen mismatches.

## Abstract

### BACKGROUND

Minor histocompatibility antigens (mHAgs) can be recognized in an allogeneic setting by the donor T-lymphocytes, leading to the appearance of graft-versus-host disease (GvHD). Polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene (CTLA-4) have been associated with autoimmune diseases and the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). We tested the hypothesis that the risk of GVHD associated with mHAgs mismatching is influenced by the CTLA-4 genotype of the donor in allogeneic HSCT.

### METHODS

We determined the incidence of acute GvHD associated with HA-1, HA-8 or H-Y mHAgs mismatches among 1295 patients receiving a HSCT from an HLA-identical sibling donor. The risk of acute GvHD where patients have specific mHAgs of patients with donors carrying the CTLA-4 rs231775AA genotype was compared with the risk among those with donors carrying the rs231775AG or GG genotypes.

### RESULTS

The incidence of acute GvHD was higher when the donor and recipient were mismatched for HA-1 or H-Y only in cases where the donor was CTLA-4 rs231775AA (hazard ratio [HR], 2.18; 95% confidence interval [CI], 1.27 to 3.75; P= 0.005 and HR, 1.50; 95%CI, 1.05 to 2.15; P= 0.025 respectively). The HA-8 and H-Y mismatches were associated with a higher risk of severe acute GvHD only when the donor was rs231775AA (HR 2.11, 95%CI, 1.06 to 4.18; P= 0.033 and HR 1.96; 95% CI, 1.15 to 3.32; P: 0.013, respectively).

### CONCLUSION

The risk of acute GvHD



































