



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE
CLINICHE**

XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**LIVELLI SIERICI DI BAFF E ATTECCIMENTO DELLA LINFOPOIESI B
DOPO IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI ALLOGENICHE:
RUOLO PATOGENETICO NELLO SVILUPPO DI GRAFT-VERSUS-
HOST-DISEASE CRONICA**

Relatore:

Professor Renato FANIN

Dottoranda:

dr.ssa Sylvie Aline OLENDO

**ANNO ACCADEMICO
2010/2011**

CAPITOLO I – INTRODUZIONE	1
I.1. La linfopoiesi B	1
I.2. Il BAFF	4
I.2.1. Recettori del BAFF	4
I.2.2. Funzioni e meccanismi d'azione del BAFF	5
I.3. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche	7
I.3.1. Il trapianto allogenico	7
I.3.1.1. Indicazioni	8
I.3.1.2. Sorgenti di cellule staminali	8
I.3.1.3. Tipo di donatore	10
I.3.1.4. Principi di condizionamento	10
a. Condizionamento convenzionale mieloablativo	11
b. Condizionamento ad intensità ridotta (RIC)	11
I.3.1.5. Complicazioni	12
I.3.1.5.1. GVHD: Classificazione	13
I.3.1.5.2. GVHD: Patogenesi	14
I.4. La graft-versus-host-disease cronica	15
I.4.1. Classificazione	15
I.4.2. Patogenesi	15
I.4.3. Cellule B e graft- versus-host-disease cronica	17
I.4.4. Fattori legati al rischio di GVHD cronica	18

I.5. Il chimerismo	20
I.5.1. Definizioni	20
I.5.2. Tecniche di analisi del chimerismo	21
I.5.2.1. Fluorescent in situ Hybridization (XY-FISH)	22
I.5.2.2. Tecniche basate sul DNA	22
I.5.2.2.1. La PCR	23
I.5.2.2.2. Short Tandem Repeats (STRs)	23
I.5.3. Esito del chimerismo	25
CAPITOLO II - SCOPO DELLA TESI	27
CAPITOLO III – MATERIALE E METODI	28
III.1. Caratteristiche dei pazienti	28
III.2. Metodi	31
III.2.1. Il chimerismo emopoietico post trapianto	31
III.2.1.1. Preparazione dei campioni	31
III.2.1.2. Estrazione del DNA	31
III.2.1.2.1. Estrazione con Puregene Blood Core Kit	32
III.2.1.2.2. Estrazione con QIAamp DNA Blood Mini Kit	32
III.2.1.2.2.1. Principi e procedura	32
III.2.1.2.2.2. estrazione manuale	33
III.2.1.2.2.3. Estrazione automatica con QIAcube	34
III.2.1.2.3. Quantificazione del DNA	34
III.2.1.2.4. PCR	34

III.2.1.2.5. Elettroforesi capillare	35
III.2.2. Analisi del BAFF	36
III.2.3. Analisi in citofluorimetria	37
III.2.4. Analisi statistiche	37
CAPITOLO IV – RISULTATI	38
IV.1. Incidenza della Graft-versus-Host-Disease cronica	38
IV.2. Ricostituzione della linfopoiesi B	39
IV.3. Chimerismo emopoietico post trapianto	42
IV.4. Correlazione tra i livelli sierici di BAFF e la GVHD cronica	44
IV.5. Sopravvivenza	45
CAPITOLO V – DISCUSSIONE	46
V.1. GVHD cronica e ricostituzione dei cellule B dopo il trapianto allogeneico	46
V.2. GVHD cronica e chimerismo B	48
V.3. GVHD cronica ed il BAFF	48
CAPITOLO VI – CONCLUSIONE	51
BIBLIOGRAFIA	52

CAPITOLO I – INTRODUZIONE

I.1. La linfopoiesi B

La sede principale della linfopoiesi B è il midollo osseo, dove le cellule staminali danno origine a cellule via via più committate, fino ad arrivare al progenitore linfoide comune e alla via differenziativa del linfocito B maturo.

Inizialmente la cellula B precoce, denominata cellula Pro-B esprime sulla sua superficie le molecole CD34, CD10 e CD19; ma non espone catene pesanti μ (μ HC) intracitoplasmatiche o di superficie. La molecola CD19 è un marcatore pan-B specifico di questa linea. Il linfocito pro-B presenta inoltre molto precocemente le molecole Ig α e Ig β .

La differenziazione delle cellule pro-B nel compartimento pre-B è caratterizzato dalla perdita di CD34 e di TdT. Il CD19 continua ad essere espresso e compaiono le catene pesanti μ associate ad un surrogato di catene leggere. Tali catene provvisorie sono costituite da 2 proteine chiamate ν preB and λ 5 [LeBien TW. Blood 2000]. La cellula Pre-B è caratterizzata inoltre dall'espressione in superficie del complesso recettoriale pre-B cell receptor (pre-BCR), composto dalle catene pesanti μ , dalle catene leggere provvisorie e dall'eterodimero di trasduzione Ig α /Ig β . Una volta raggiunto un livello sufficiente di catene μ e di catene leggere provvisorie C, queste si associano tra loro e formano con le molecole Ig α e Ig β il recettore pre-B.

Gli elementi pre-B vengono distinti in pre-BI e pre-BII sulla base della loro attività mitotica:

Le pre-BI sono definiti come grandi cellule in proliferazione e sono caratterizzati da un'importante spinta proliferativa, mentre le pre-BII appaiono come piccoli linfociti post-mitotici e presentano una minore attività duplicativa. Le pre-BII sono in grado di riarrangiare attivamente le catene leggere κ e λ . Inoltre tale linfocito è caratterizzato dall'espressione del BCR (costituito da un'immunoglobulina M di superficie e dalle molecole CD79a e CD79b), del CD19 e di altre due molecole: il CD22 e il CD10 o CALLA (*Common Acute Lymphoblastic Leukemia Associated*) ed è probabilmente in grado di raggiungere il sangue periferico.

Quando ha luogo un riarrangiamento efficace delle catene leggere, esse scalzano rapidamente le catene leggere provvisorie per associarsi alla catena pesante μ e formare una immunoglobulina M (IgM) che, associata a Ig α e Ig β , è trasportata alla superficie cellulare. Questa cellula si differenzia in un linfocito B esprimendo sia IgM che IgD in superficie.

Il linfocito B maturo è in grado di circolare e raggiungere gli organi linfoidi secondari. Esso viene definito anche linfocito B naïve. Le cellule B hanno un ruolo centrale nella risposta immune umorale. Producono gli anticorpi e forniscono una protettiva difesa contro gli agenti patogeni virali e batterici [Sanchez-García J. et al. Haematologica 2006].

La stimolazione di questa cellula ad opera di un antigene causa la sua proliferazione e la sua progressiva differenziazione in una plasmacellula. Per gli antigeni timo-dipendenti, questo processo necessita dell'interazione del linfocito B con il linfocito T e la secrezione da quest'ultimo di alcune citochine (IL4, IL10, IL13) induce la produzione d'immunoglobuline con isotipi differenti dalle IgM [Sanchez-García J. et al. Haematologica, 2006].

Il centro germinativo linfonodale rappresenta un microambiente in cui i linfociti B naïve, in presenza di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche in grado di presentare l'antigene vanno incontro a una rapida espansione clonale, originando i cosiddetti centroblasti. In questa fase i centroblasti esprimono il prodotto del gene BCL6, che è un repressore trascrizionale del programma differenziativo B.

I centroblasti mantengono molecole di superficie tipiche del linfocito B maturo, come il CD19 e il CD22 ma tornano a esprimere intensamente il CD10, espressa allo stadio di pre-B. Nel centrocito, l'espressione del CD10 diminuisce e aumenta quella del CD35, importante per l'interazione con le cellule dendritiche ed i linfociti T e per la differenziazione a plasmacellule.

Il destino del centrocito è di divenire depositario della memoria "molecolare" della selezione positiva (cellule memoria) o di essere avviato direttamente verso la differenziazione plasmacellulare. I segnali che iniziano la differenziazione verso plasmacellule o verso linfocito B memoria sono chiaramente distinti. Il CD40 espresso dai centrociti favorisce la differenziazione in elementi memoria. Al contrario, l'espressione selettiva di alcuni fattori trascrizionali guida alla differenziazione plasmacellulare.

La trasformazione in plasmacellula comporta un'intensa attività di sintesi e secrezione di immunoglobuline e l'espressione di antigeni di superficie caratteristici come il CD38, il CD138 e l'EMA (*epithelial membrane antigen*), mentre è inibita l'espressione di quelli caratteristici della filiera B matura (CD19) (vedi figura 1).

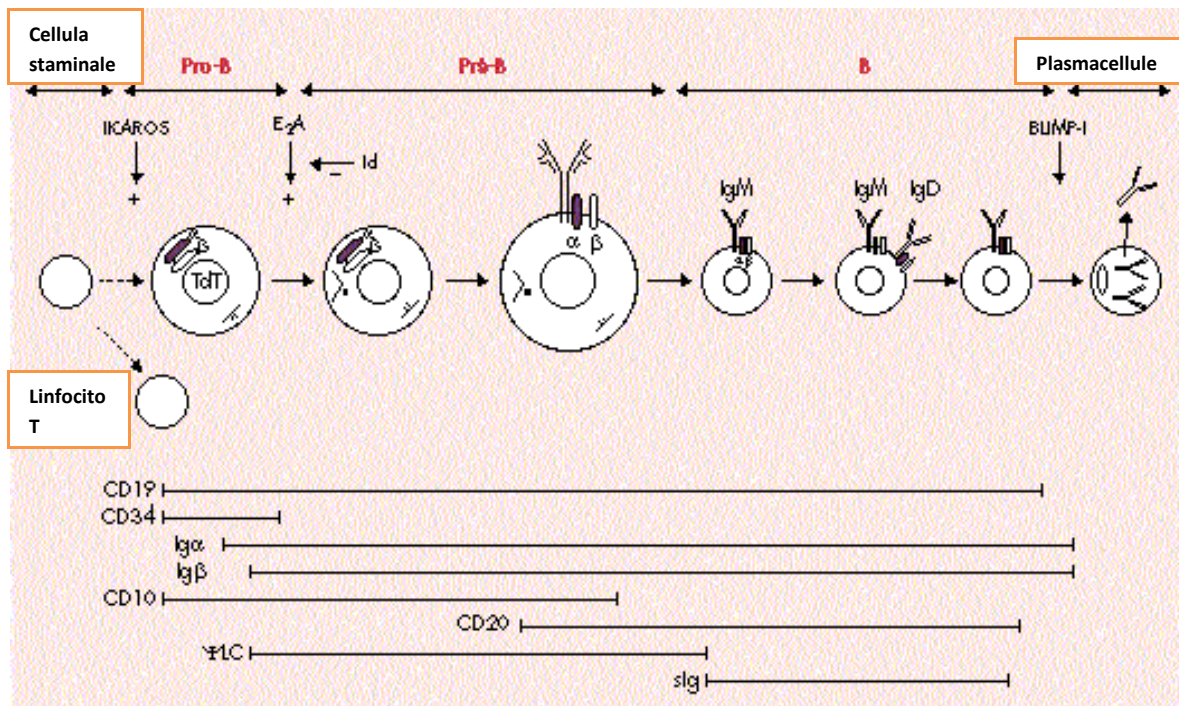


Figura 1: Stadi evolutivi della linfopoiesi B

I.2. Il BAFF

Il BAFF (anche chiamato BlyS, TALL-1, THANK and ZNF-4) è un membro della famiglia dei tumor necrosis factor (TNF). È una proteina transmembrana di tipo 2 che può essere espressa sulla superficie delle cellule della linea mieloide [Schneider P et al. J Exp Med 1999] [Shu HB et al. J Leukoc Biol 1999] [Mukhopadhyay A, et al. J Biol Chem 1999]. Viene prodotto notoriamente anche dalle cellule dendritiche che esprimono il CD11c a alti livelli [Nardelli B et al. Blood 2001]. Può anche venir scisso dalle proteasi endocellulari, e successivamente secretato dalle cellule come un ligando solubile.

Viene prodotto da macrofagi, granulociti, cellule natural killer (NK) [Sarantopoulos S, et al. Clin Cancer Res. 2007], alcune cellule T [Schneider P et al. J Exp Med 1999], e cellule dello stroma midollare. È probabile che altre cellule, non ancora identificate, producano il BAFF nei siti dove le cellule B e le plasmacellule sono mantenute a lungo termine.

Sia l'infiammazione che la linfopenia sono note per promuovere la secrezione di BAFF [Ueda Y, et al. J Exp Med 2004] e la produzione locale di BAFF nei siti d'infiammazione può anche condurre all'autoimmunità [Schneider P et al. Curr Opin Immunol. 2005].

Il BAFF può essere misurato in tutti i fluidi corporei.

Il gene che codifica il BAFF è localizzato sul cromosoma umano 13q34 e sul cromosoma 8 del topo [Jiang Y et al. Immunogenetics 2001]. Il locus umano 13q34 è spesso traslocato nel linfoma di Burkitt [Berger R, et al. Genes Chromosomes Cancer 1989].

I.2.1. Recettori del BAFF

Sia il BAFF umano che quello murino si legano a tre recettori con delle affinità simili: BCMA (B cell maturation antigene), TACI (transmembrane activator e CAML-interactor), e BAFF-R (BAFF receptor) [Gross JA et al. Nature 2000] [Thompson JS, et al. J Exp Med 2000] [Gras MP et al. Int Immunol 1995]. I 3 recettori appartengono tutti alla famiglia dei recettori transmembrana. Tutti e 3 sono espressi sui linfociti B CD19+ e TACI è anche espresso su alcune cellule T [Gross JA, et al. Nature 2000] [Marsters SA, et al. Curr Biol 2000] [Rennert P, et al. J Exp Med 2000].

Le plasmacellule esprimono TACI e/o BCMA e la loro sopravvivenza può essere sostenuta sia da BAFF che da APRIL (A proliferation-inducing ligand). Entrambi vengono secreti da numerosi tipi di cellule presenti nel linfonodo o nel microambiente midollare [Mohr E, et al. J Immunol 2009].

APRIL, un altro membro della famiglia dei ligandi TNF-like, non è stato dimostrato in tessuti normali, però è fortemente surregolato in molte cellule tumorali [Marsters SA, et al. Curr Biol 2000] [Ware CF. et al. J Exp Med 2000] che non esprimono il recettore specifico del BAFF, suggerendo che l'APRIL abbia anche un suo recettore specifico [Rennert P, et al. J Exp Med 2000] [Hahne M, et al. J Exp Med 1998].

L'APRIL, come il BAFF, si lega al BCMA ed a TACI pero non a BAFF-R, mentre BAFF si lega a BCMA, TACI e BAFF-R ma non ad APRIL-R sulle le cellule B.

1.2.2. Funzioni e meccanismi d'azione del BAFF

Il BAFF svolge un importante ruolo nell'immunità umorale. È anche un essenziale componente della risposta immune innata ed è indotto nelle cellule dendritiche mieloidi dagli interferoni (IFN) di tipo I [Boule MW, al. J Exp Med 2004]. Le sue funzioni sono sostanzialmente 3: come fattore anti apoptico, come fattore stimolante lo switch isotipico e come fattore attivante dei linfociti T.

1. La sopravvivenza dei linfociti B [Stuart G. et al. Seminars in Immunology 2006]: BAFF è capace di legarsi a tutte le cellule B murine periferiche [Shulga-Morskaya S, et al. J Immunol 2004] [O'Connor BP, et al. J Exp Med 2004]. Tuttavia, non influenza la sopravvivenza di tutte le cellule B in modo uguale. BAFF non ha effetto sulle cellule B immature del midollo osseo. Mantiene la sopravvivenza delle cellule B modificando l'espressione delle molecole pro- e anti-apoptotiche.

Porta ad un'aumentata sopravvivenza in vitro sia le cellule B immature di tipo I e II che le cellule B mature della milza. Tramite la sua interazione col BAFF-R, sostiene la sopravvivenza e la maturazione dei linfociti B immaturi che possono ancora venire selezionati negativamente [Melchers F. Ann Rheum Dis. 2003].

Inoltre, li protegge dall'apoptosi per contatto con uno dei suoi recettori, cioè uno dei 3 membri della famiglia dei recettori del TNF (BCMA, BAFF-R e TACI).

Il BAFF agisce da regolatore per la selezione delle cellule B come viene dimostrato dal fatto che un'aumentata competizione per il BAFF risulta in una maggiore eliminazione di cellule B autoreattive. Al contrario, la decrementata competizione per il BAFF nel contesto di linfopenia B o di elevati livelli di BAFF circolanti risulta nella diminuzione della selezione dei linfociti B con conseguente maggiore rilascio di cellule B autoreattive naïve.

L'espressione del BAFF-R è regolata dal legame del B cell receptor (BCR) sulle cellule B mature [Cancro MP. Immunol Rev 2004] ed è il recettore predominante espresso sulle cellule B memoria [Avery DT, et al. J Clin Invest 2003].

La trasmissione del segnale generato dal legame di BCR con il suo ligando porta a produrre la proteina p100, la cui presenza è necessaria per la via di trasduzione del BAFF-R che porta alla sopravvivenza delle cellule B [Moisini I. et al. Clinical and Experimental Immunology, 2009]. La mancanza di p100 causa la morte delle cellule B per un insufficiente segnale del BAFF-R. La quantità di p100 generata dal segnale di BCR è sufficiente per la sopravvivenza BAFF-dipendente dei linfociti B transizionali tardivi e follicolari e l'assenza di BAFF conduce ad una sopravvivenza distintamente ridotta di queste cellule [Stadanlick JE, et al. Nat Immunol 2008].

2. l'induzione di switch isotipico : È un meccanismo dal quale le cellule B attivate (plasmacellule) cambiano la loro produzione di anticorpi da un isotipo ad un altro, per esempio da IgM a IgG. BAFF stimola lo switching degli isotipi IgG, IgA e IgE nelle cellule B. Insieme all'IL 6, il BAFF promuove le Ig class-switching e la differenziazione delle plasmacellule [Trembl LS, et al. J Immunol 2007] [Katsenelson N, et al. Eur J Immunol 2007] [Moisini I. et al. Clinical and Experimental Immunology, 2009].

3. Attivazione dei linfociti T: BAFF può aumentare le risposte non solo delle cellule B, ma anche delle cellule T. Sebbene BAFF-R sia espresso sulla maggior parte delle cellule B, la sua espressione non è ristretta alla linea B. Una piccola proporzione di cellule T è stata trovata capace di legare il BAFF solubile attraverso il BAFF-R [Ye Q, Wang L, et al. Eur J Immunol 2004].

L'evidenza che il BAFF sia elevato in numerosi stati di patologie che coinvolgono le cellule B e che il BAFF promuove la sopravvivenza di quelle cellule, conduce all'ipotesi che il BAFF ed i suoi recettori possano essere coinvolti nello sviluppo e nella patogenesi di alcune patologie maligne dei linfociti B. Le cellule B maligne di pazienti con LLC-B, LNH, mieloma multiplo sono tutti capaci di legare il BAFF solubile [Novak AJ, et al. Blood 2002] [Novak AJ, et al. Blood 2004] [Moreaux J, et al. Blood 2004].

BAFF protegge i linfociti B normali dall'apoptosi modulando l'espressione dei membri della famiglia bcl-2 [Lesley R, et al. Immunity 2004].

È possibile che la produzione aberrante e/o eccessiva di BAFF dalle cellule B maligne (cioè autocrina) o dalle cellule presenti nelle nicchie microambientali occupate dalle cellule maligne (cioè paracrina) possa facilitare la loro crescita e la loro sopravvivenza [Stuart G. et al. Seminars in Immunology 2006] mentre la neutralizzazione del BAFF risulti nel miglioramento della patologia autoimmune [Kayagaki N, et al. Immunity. 2002].

I.3. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche

L'applicazione delle tecniche trapiantologiche ha registrato una progressiva estensione delle indicazioni sino a diventare un trattamento di prima linea già nelle fasi iniziali di alcuni disordini neoplastici. I progressi ottenuti nelle conoscenze biologiche del trapianto hanno consentito un'estensione di questa procedura a situazioni cliniche non maligne, come nel caso delle emoglobinopatie, e hanno migliorato le indicazioni per quanto attiene il tipo di trapianto. Esistono tre tipi principali di trapianto emopoietico (allogeneico, singeneico, autologo) che differiscono in relazione al donatore di cellule emopoietiche. La scelta tra questi dipende da diversi fattori tra cui la malattia di base e la disponibilità di un donatore adeguato [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

La procedura del trapianto consiste in alcuni passaggi fondamentali, costituiti dalla scelta delle cellule staminali (da midollo, sangue periferico, cordone ombelicale), dall'uso di regimi preparativi ("condizionamento"), dall'esecuzione del tipo di trapianto e dei problemi connessi (tipizzazione HLA e scelta del donatore nel caso del trapianto allogeneico), eventuale decontaminazione (purgino) cellulare nel caso di trapianto autologo. Infine, la procedura presenta alcune complicazioni quali la Graft-versus-Host-Disease (GvHD), la Venocclusive disease (VOD), le infezioni, la mucosite e eventuali seconde neoplasie [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

I.3.1. Il trapianto allogeneico

Il *trapianto allogeneico* consiste nell'inoculare in un paziente debitamente trattato le cellule emopoietiche prelevate da donatori sani, consanguinei o non consanguinei, parzialmente o totalmente identici al ricevente per quanto riguarda gli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). Si parla di trapianto *singeneico* se il donatore di cellule staminali è un gemello geneticamente identico al ricevente. La limitata disponibilità di donatori consanguinei HLA-identici ha portato alla creazione di banche di donatori non consanguinei HLA-compatibili per poter eseguire trapianti di midollo da donatori non familiari (MUD Matched Unrelated Donor) [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

L'esecuzione di un trapianto allogeneico richiede:

- 1- riduzione delle cellule neoplastiche residue e dell'emopoiesi del paziente (regime di condizionamento);
- 2- immunosoppressione post-trapianto (per favorire l'attecchimento delle cellule staminali del donatore ed evitare il rischio di rigetto, oltre a prevenire la Graft-versus-Host-Disease (GvHD):

3- prevenzione e trattamento delle infezioni sia quelle precoci (batteriche e fungine) legate alla neutropenia nella prima fase del trapianto, sia quelle "tardive" (soprattutto virali), legate al lento recupero immunologico [Apperley J., et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

I.3.1.1. Indicazioni

Il trapianto allogenico si attua generalmente per pazienti con età inferiore ai 55-60 anni con patologie secondarie ad un'importante alterazione quali-quantitativa del compartimento staminale midollare sia congenita che acquisita. Nel caso delle leucemie acute mieloidi, viene eseguito preferibilmente su pazienti in prima remissione completa con profilo citogenetico sfavorevole e quelli con rischio intermedio. Sono invece esclusi i pazienti con basso rischio in risposta alla terapia [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

Attualmente, i nuovi regimi di condizionamento a ridotta tossicità hanno permesso di estendere l'indicazione a soggetti con più di 65 anni e con donatori parzialmente compatibili.

I.3.1.2. Sorgenti di cellule staminali

- Midollo osseo

Rappresenta la fonte classica di cellule staminali utilizzabili ai fini trapiantologici. Tradizionalmente, le cellule staminali emopoietiche vengono raccolte dalla cresta iliaca posteriore sotto anestesia generale o locale.

Il tessuto midollare risulta costituito da una commistione di elementi midollari e di sangue periferico. La quantità di cellule mononucleate utile per un buon attecchimento non è definita con certezza: si ritiene tuttavia che il valore ottimale possa essere rappresentato da una quantità di cellule CD34+ $>2 \times 10^6$ /kg di peso del ricevente. Questo dato comporta l'acquisizione di un volume di sangue midollare da 700 a 1500ml, a secondo del grado di diluizione [Apperley J., et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008] [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

- Sangue periferico

La dimostrazione che cellule emopoietiche staminali siano presenti nel sangue periferico è venuta dall'osservazione che dopo trattamento con fattori di crescita (CSF) o dopo chemioterapia ci sia un progressivo incremento di questi elementi in circolo, un processo definito come mobilizzazione.

Numerosi fattori di crescita, da soli o in associazione con chemioterapia, si sono dimostrati idonei a mobilitare le cellule staminali, in particolare Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) e Granulo-Monocyte Colony stimulating Factor (GM-CSF).

Le cellule staminali mobilizzate hanno caratteristiche fenotipiche simili alle cellule CD34+ presenti nel midollo osseo e sono in grado di indurre un recupero ematologico temporalmente più rapido rispetto all'infusione di cellule midollari [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

- **Cordone ombelicale**

Il sangue contenuto nel cordone ombelicale e nella placenta al momento della nascita rappresenta una sorgente particolarmente ricca di cellule staminali. La relativa immaturità di queste cellule consente di superare più facilmente la barriera immunologica nelle fasi di attecchimento rispetto alle cellule derivanti da altri sorgenti [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007] (vedi tabella 1).

Le principali differenze tra fonti cellulari sono consegnate nella tabella seguente:

Midollo osseo	Raccolta in anestesia generale, Limitato numero di cellule staminali emopoietiche Numero mediano di cellule CD34+: $2,8 \times 10^6$ /kg Numero mediano di cellule T: 2.2×10^7 /kg
Sangue periferico	Raccolta da accesso venose periferico Non necessita di anestesia generale Elevato numero di cellule Numero mediano di cellule CD34+: 7×10^6 /kg Numero mediano di cellule T: 27×10^7 /kg
Unità cordonale	Raccolta facile ed inoffensiva Immediata disponibilità delle unità criopreservate Meno rischio di malattie trasmissibili Il numero di cellule è un fattore limitante Numero mediano di cellule CD34+: 0.2×10^6 /kg Numero mediano di cellule T: 0.4×10^7 /kg

Tabella 1 : Principali differenze tra fonti di cellule staminali

I.3.1.3. Tipo di donatore

Il donatore di cellule staminali emopoietiche può essere sia familiare (sibling) che non consanguineo (Matched Unrelated Donor, MUD). La mancanza di un donatore adeguato nell'ambito di una famiglia ha portato a istituire dei registri di donatori di midollo osseo in molte nazioni. In Italia, è il Registro Nazionale dell'Associazione donatori di Midollo Osseo. La ricerca di un donatore non consanguineo viene attivata con precise indicazioni di elegibilità da parte dei centri autorizzati. Il trapianto da donatore MUD è un trapianto complesso, soprattutto per l'eventuale presenza di uno o più aplotipi differenti, che determinano un incremento significativo, sia per incidenza sia per gravità, della GVHD [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

I.3.1.4. Principi di condizionamento

Il condizionamento ha un ruolo centrale nel trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT). È fonte del dilemma compreso nell' HSCT: come eliminare la malattia senza provocare eccessiva tossicità. È la causa-chiave di una precoce mortalità. Il termine "condizionamento" in ambito trapiantologico significa preparare il paziente al trapianto. Si riferisce a quelle procedure che precedono l'infusione di cellule emopoietiche e che consistono nell'applicazione di regimi chemio e/o radioterapici. Il condizionamento ha tre principali scopi: "la creazione di uno spazio", l'immunosoppressione sufficiente a ottenere un attecchimento delle cellule trapiantate, e l'eradicazione delle cellule patologiche appartenenti alla malattia di base [Apperley J, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

-Creazione dello spazio: È un concetto controverso che origina dalla convinzione che le cellule progenitrici immature occupino delle nicchie definite nello stroma midollare per ottenere il supporto necessario per la proliferazione e la differenziazione. Le cellule staminali dell'ospite devono essere eradicare per permettere alle cellule staminali del donatore di ottenere un accesso a queste nicchie ed il loro attecchimento [Apperley J, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

-Immunosoppressione per prevenire una reazione del trapianto contro l'ospite: L'immunosoppressione è necessaria per prevenire un rigetto delle cellule del donatore ad opera delle cellule immuni dell'ospite in caso di trapianto allogenico. La necessità di immunosoppressione aumenta con la disparità nel sistema HLA (Antigeni maggiori d'istocompatibilità). Il rischio di rigetto è aumentato nelle situazioni in cui il ricevente è stato "pre-sensibilizzato" contro l'HLA, per esempio in caso di somministrazione di prodotti derivati di sangue prima del HSCT. Vice versa, la tolleranza al trapianto è aumentata con elevate dosi di cellule staminali e di cellule T [Apperley J., et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

-Eradicazione delle cellule patologiche: Lo scopo principale del regime di condizionamento è il controllo a lungo termine della malattia. L'attecchimento parziale può essere sufficiente in situazioni in cui solo un "prodotto specifico" sia necessario, per esempio i linfociti B in alcuni stati d'immunodeficienza [Apperley J., et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008] o in casi di emoglobinopatie. Nel caso di patologie maligne, il condizionamento agisce anche come vera e propria chemioterapia eradicante.

a. Condizionamento convenzionale mieloablativo

Il concetto del condizionamento mieloablativo si basa sull'effetto di una importante citoreduzione di tutte le cellule emopoietiche, tumorali e non, del paziente ed il controllo antitumorale immunologico assicurato dai linfociti T allogenici chiamato effetto "Graft versus Leukemia" (GVL) . L' attecchimento delle cellule infuse è solitamente rapido e completo. È realizzato con delle dosi elevate di chemioterapia e con radioterapia. La tossicità di questo condizionamento è notevole e presenta alti rischi di complicazioni infettive e emorragiche (vedi tabella 2).

b. Condizionamento ad intensità ridotta (RIC)

Il condizionamento RIC si pone come obiettivo l'eradicazione del tumore e la sostituzione dell'emopoiesi del ricevente non attraverso una terapia citotossica ma tramite l'effetto immunomediato operato dal sistema immunologico allogenico. I trapianti con regime di condizionamento RIC sono realizzati con l'utilizzo di agenti immunosoppressori e presentano una contenuta tossicità, utile soprattutto nel caso di pazienti anziani. Tendenzialmente, il rischio di GVHD e di complicazioni infettive risultano inferiori, mentre pare essere maggiore il rischio di ricaduta rispetto ad un trapianto effettuato con un regime di condizionamento mieloablativo [Apperley J., et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008] (vedi tabella 2).

Regime	Dose totale	Dose/die	somministrazione	giorno
Regime convenzionale				
Cy/TBI Ciclofosfamide irradiazione corporea totale	120 mg/kg 12-14.4 Gy	60 mg/kg 2-2.4Gy (2x/gg)	IV in 1 ora	-6, -5 -3, -2, -1
Bu/Cy Busulfano Ciclofosfamide	16 mg/kg 200 mg/kg	4 mg/kg 50 mg/kg	Via orale IV in 1 ora	-9, -8, -7, -6 -5, -4, -3, -2
BACT BCNU ARA-C Ciclofosfamide 6-Tioguanina	200 mg/kg 800 mg/kg 200 mg/kg 800 mg/m ²	200 mg/m ² 200 mg/m ² 50 mg/kg 200 mg/m ²	IV in 2 ore IV in 2 ore IV in 1 ora Via orale	-6 -5, -4, -3, -2 -5, -4, -3, -2 -5, -4, -3, -2
Regime RIC				
TBI/Fluda Irradiazione corporea totale Fludarabina	2 Gy 90 mg/m ²	2 Gy 30 mg/m ²	IV in 30 min	0 -4, -3, -2
Fluda/Bu/ATG Fludarabina Busulfano ± (ATG) Antiglogulina T	180 mg/m ² 8 mg/kg 40 mg/kg	30 mg/m ² 4 mg/kg 10 mg/kg	IV in 30 min Via orale IV in 8-10 ore	-10 a -5 -6, -5 -4, -3, -2, -1

Tabella 2 : Regimi di condizionamento

I.3.1.5. Complicazioni

Le principali complicazioni del HSCT allogenico si distinguono in:

a) il rigetto insorge più spesso nei HSCT fenoidentici o da sangue cordonale. Più raramente nei HSCT genoidentici totalmente compatibili (10/10).

b) La malattia veno oclusiva epatica (VOD) è una complicanza maggiore che può comparire nei primi 35-40 giorni dopo il HSCT come conseguenza dell'epatotossicità indotta dalla chemioterapia del di condizionamento. La lesione di origine tossica del fegato si definisce istologicamente da un'ostruzione non trombotica della vena centrolobulare con coinvolgimento degli epatociti. I fattori di rischio i più importanti sono l'elevazione del livello di SGOT prima del trapianto allogenico, la dose d'irradiazione e la dose di busulfano.

c) Le complicanze infettive durante la prima fase aplastica, fino a 2 settimane dopo il trapianto allogenico, non sono diverse da quelle incontrate in altri pazienti severamente neutropenici. La mortalità legata alle infezioni in questo periodo è principalmente dovuta a sepsi batteriche, polmoniti (Streptococchi principalmente *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*), infezioni fungine principalmente dovute a *Aspergillus* e *Candida* e infezioni virali principalmente legate a virus *Herpes Simplex*. Nella fase di immunodeficienza con un numero basso di cellule T citotossiche, c'è un maggior rischio di riattivazione del citomegalovirus (CMV). È anche il periodo di insorgenza di infezione da *Aspergillus* e parassiti (*Toxoplasma gondii* e *Pneumocystis carinii*).

d) La graft-versus-host-disease (malattia da reazione del trapianto verso l'ospite, GVHD) è una sindrome caratterizzata dalla reazione di cellule immunocompetenti T presenti nell'inoculo midollare del donatore contro tessuti del ricevente. Nella maggior parte dei casi la reazione è rivolta contro antigeni minori di istocompatibilità dell'ospite. È la più comune complicazione del trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT).

La GVHD rappresenta il limite principale alla pratica e l'efficacia del trapianto di midollo allogenico di cellule staminali.

I.3.1.5.1. GVHD: Classificazione

Può essere classificata acuta e cronica. Secondo gli schemi classici la forma di GVHD che si manifesta precocemente dopo il trapianto (entro 100 giorni) viene definita come GVHD acuta (aGVHD), mentre viene designata come GVHD cronica (cGVHD) quella che insorge più tardivamente. Attualmente questa definizione non viene più estesamente applicata dopo l'introduzione di regimi di condizionamento ad intensità ridotta o dopo l'infusione di linfociti da donatore che mostrano come le due forme, che peraltro hanno caratteristiche cliniche diverse, possono manifestarsi non seguendo affatto i tempi di comparsa al suo tempo definiti [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

I.3.1.5.2. GVHD: Patogenesi

La GVHD si sviluppa ad opera delle cellule T del donatore che riconoscono il sistema maggiore e minore di Istocompatibilità del ricevente. Nel caso di trapianti HLA-identici, sia MUD che familiari, le cellule T del donatore riconoscono un sotto-insieme di peptidi del ricevente chiamati antigeni minori d'istocompatibilità (miHA), derivati dall'espressione di geni polimorfici che differiscono nel ricevente dal donatore. È stato dimostrato in un modello murino MHC-matched e miHA multiplo mismatched di GVHD indotta solo dalle cellule T CD8⁺ del donatore che le cellule presentanti l'antigene (APC) intatte del ricevente sono assolutamente necessarie per la GVHD [Shlomchik WD et al. Science. 1999]. Nella GVHD MHC-mismatched, le APC del ricevente si sono rivelate fondamentali e la loro deplezione ad opera delle cellule alloreattive natural killer (NK) è in grado di diminuire l'incidenza della GVHD [Ruggeri L, et al. Science. 2002] [Teshima T, et al. Nat Med. 2002].

Nei riceventi maschi di cellule staminali da parte di donatori di sesso femminile, gli antigeni minori d'istocompatibilità HY sono i bersagli delle cellule T del donatore [Mutis T, et al. Nat Med 1999].

I.4. La graft-versus-host-disease cronica

La graft-versus-host-disease cronica è un disordine autoimmune che insorge circa 100 giorni dopo il trapianto allogenico approssimativamente nel 60-80% dei sopravvissuti a lungo termine [Ratanatharathorn V, et al. Blood 1998] [Nash RA, et al. Blood 2000]. Rappresenta attualmente una delle complicazioni più frequenti fra le complicazioni tardive del trapianto allogenico a causa dell'incrementato uso di cellule staminali ottenute per mobilizzazione dal sangue periferico (anziché per espanto midollare) e dell'età sempre più avanzata dei pazienti [Castoldi G. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione, 2007].

Questa complicanza immunologica coinvolge numerosi organi (cute, fegato, occhi, cavità orale, polmone) e rappresenta una causa maggiore di morbosità e di mortalità [Wingard JR, et al. Blood 1989].

L'incidenza della cGVHD è probabilmente in aumento anche a causa dell'uso dei donatori non familiari e dell'inclusione di riceventi anziani e di regimi di condizionamento non mieloablativi. Può avere esito fatale anche a causa della profonda compromissione immunologica che viene indotta dalle terapie.

I.4.1. Classificazione

Il sistema di classificazione categorizza i pazienti in cGVHD estesa o cGVHD limitata in base ad un semplice punteggio (vedi tabella 3).

Numero di organi	leggera cGVHD	moderata cGVHD	severa cGVHD
1 organo o sito	punteggio 1	punteggio 2	punteggio 3
2 organi o siti	punteggio 1	punteggio 2	punteggio 3
3 o più organi		punteggio 1	punteggio 3
Coinvolgimento del polmone		punteggio 1	punteggio 2

Tabella 3 : Classificazione della GVHD cronica secondo NIH working group.

I.4.2. Patogenesi

Al contrario della graft-versus-host-disease acuta (aGVHD), la fisiopatologia della cGVHD non è ben compresa. Sebbene entrambe le entità si sovrappongano estesamente in termine di patogenesi, numerose linee di evidenza suggeriscono che la cGVHD non è soltanto una continuazione della aGVHD. La prima è soprattutto un processo infiammatorio e fibrotico, mentre il secondo richiede apoptosi e necrosi

[José A Pérez-Simón et al. *Drugs* 2006]. In più, il 25-35% della cGVHD compare *de novo* senza nessuna aGVHD precedente.

La cGVHD inizia con l'espansione delle cellule T del donatore in risposta agli alloantigeni o autoantigeni che non sono controllati dai meccanismi di delezione normale timica o periferica. I precursori delle cellule T possono subire un'educazione timica aberrante che li rende autoreattivi [Pérez-Simón JA, et al. *Drugs* 2006].

Il ruolo dell'alloreattività contro l'autoreattività nella patogenesi della cGVHD rimane un'area di intenso dibattito. L'alloreattività agli antigeni minori d'istocompatibilità spiega la cGVHD come una fase tardiva della aGVHD. Per contro, le manifestazioni della cGVHD simula spesso quelle delle malattie autoimmuni. Le cellule T inducono dei danni agli organi-bersaglio sia direttamente con un attacco citolitico, citochine infiammatorie e fibrosi, sia con l'attivazione delle cellule B e la conseguente produzione d'anticorpi.

In questo senso, c'è un'evidenza crescente che la disregolazione delle cellule B può contribuire alla patogenesi della cGVHD. In un modello murino di cGVHD, l'espansione delle cellule B dell'ospite ha mostrato avere un ruolo centrale nello sviluppo della cGVHD tramite la produzione d'anticorpi e una successiva glomerulonefrite [Saitoh T, et al. *Clin immunol immunopathol* 1991].

Tuttavia, il ruolo patogenetico degli autoanticorpi nella cGVHD rimaneva mal definito e non dimostrato conclusivamente.

Non è inoltre ancora chiaro il pattern citochinico prevalente della aGVHD rispetto alla cGVHD. Inizialmente alcuni dati indicavano un incremento del pattern Th2 in casi di cGVHD, mentre altri studi, anche su modelli murini, hanno mostrato degli alti livelli di alcune citochine di tipo Th2 quali IL-4, IL-5 e IL-10 in casi di aGVHD [Garsili CG, et al. *Mol Immunol* 1993].

Oltre alla funzione timica danneggiata, meccanismo che può essere la prima ragione della anomala ricostituzione T cellulare, i meccanismi periferici di tolleranza come le cellule dendritiche immature che contribuiscono a mantenere un'auto-tolleranza immunologica, sono alterati e giocano un ruolo importante nello sviluppo sia della aGVHD che della cGVHD. In particolare, le cellule dendritiche del ricevente e del donatore possono contribuire all'induzione della cGVHD mediata dalle CD4+ al livello cutaneo (principalmente del ricevente) o intestinale (principalmente dal donatore) [Shlomchik WC, et al. *Science* 1999] [Anderson B et al. *Blood* 2005].

Altri meccanismi coinvolti nel mantenimento della self-tolleranza, come le cellule T regolatorie, sono ridotti frequentemente nei pazienti con diagnosi di cGVHD.

1.4.3. Cellule B e graft-versus-host-disease cronica

Recentemente si è man mano evidenziato il fatto che la cGVHD sia associata ad una perturbazione dell'omeostasi delle cellule B, il cui ruolo patogenetico è stato sottostimato a lungo tempo.

Negli ultimi anni, vari studi hanno indicato le similarità cliniche tra la cGVHD ed alcune malattie autoimmuni come il lupus sistemico e la sclerodermia, caratterizzate dalla produzione di auto-anticorpi, suggerendo che tali cellule giocano un ruolo nello sviluppo di questa patologia (cGVHD) [Zhang C, et al. Blood 2006].

La disregolazione del processo infiammatorio presente nella GVHD può condurre all'attivazione di cellule B autoreattive e ad una produzione di autoanticorpi. Lo sviluppo di questi anticorpi necessita per altro della presenza di cellule T CD4⁺ allo reattive, e la comparsa ed il titolo di autoanticorpi sono stati correlati all'inizio e all'attività della GVHD [Patriarca F, et al. exp Hematol. 2006] [Svegliati S, et al. Blood. 2007]. Tuttavia, la definizione del ruolo patogenetico degli autoanticorpi all'interno della cGVHD è ancora fonte di dibattito poiché altri autori non hanno trovato correlazioni con l'inizio o la severità della malattia [Chan EY, et al. Pathology. 1997].

L'evidenza suggerisce che, unitamente alla produzione di anticorpi, le cellule B possono contribuire alla risposta immune con meccanismi anticorpo-indipendenti come la presentazione di antigeni, la produzione di citochine e chemochine o agendo come cellule regolatrici.

I pazienti che sviluppano una cGVHD presentano una relativa riduzione nelle cellule B naïve ed una conta relativamente alta delle cellule B di tipo memoria attivate CD27+. Inoltre, un maggior contenuto di cellule B nel trapianto è stato identificato come un fattore di rischio per l'insorgenza di cGVHD [Baron F, et al. Blood. 2007 : Abstract 1077] [Panse JP, et al. Br J Haematol. 2005].

Infine, il ruolo patogenetico dei linfociti B in questa malattia è stato dimostrato anche grazie all'osservazione che la terapia con Rituximab, l'anticorpo monoclonale anti-CD20, ha portato ad un miglioramento clinico in alcuni pazienti con cGVHD resistente ai steroidi [Zaja F et al. Bone Marrow Transplantation, 2007] [Brink R, Semin Immunol 2006] [Mariette X, et al. Ann Rheum Dis 2003].

Per quanto concerne lo stato di attivazione delle cellule B e quindi dei livelli di BAFF, sono stati correlati allo sviluppo alla severità della cGVHD. In particolare a causa del fatto che alti livelli di BAFF in presenza di una bassa conta di cellule B naïve può alimentare la sopravvivenza delle cellule B alloreattive ed autoreattive attivate, risultando in una patologia immune [Shimabukuro-Vornhagen A, et al. Blood. 2009].

La figura 2 riassume le conoscenze del potente coinvolgimento delle cellule B nella cGVHD.

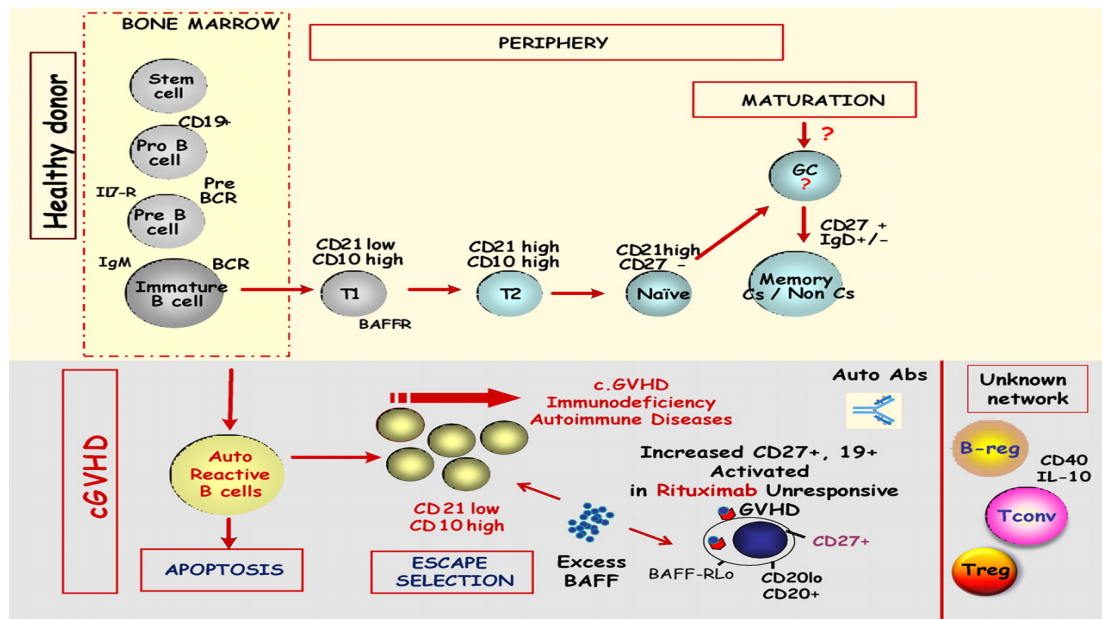


Figura 2 [Socié G, Blood 2011] : Omeostasi delle cellule B nella GVHD. La parte superiore della figura schematizza la maturazione fisiologica delle cellule B dal midollo osseo al sangue periferico . BCR indica recettore delle cellule B; IL7-R, recettore dell'interleuchina 7; T1, cellule B transizionali 1; T2, cellule B transizionali 2; Cs, class switch; e GC, centro germinativo. La parte di sotto schematizza le conoscenze delle cellule B nella patogenesi della GVHD cronica. Breg indica cellule B regolatorie; Treg, cellule T regolatorie; Tconv, cellule T convenzionali; and BAFF, fattore di attivazione delle cellule B.

1.4.4. Fattori legati al rischio di GVHD cronica

L'HLA disparità tra donatore e ricevente è un potente fattore di rischio. La cGVHD compare approssimativamente nel 40% dei pazienti che ricevono il trapianto senza manipolazioni da famigliari HLA-identici, nel 50% di quelli che ricevono trapianti famigliari HLA mismatched e nel 70% dei trapianti non famigliari (MUD) [Pérez-Simón JA, et al. Drugs 2006].

L'età del ricevente. L'incidenza della cGVHD aumenta di 13% nei pazienti >10 anni [Pérez-Simón JA, et al. Drugs 2006].

Il sesso deve essere considerato fra le caratteristiche del donatore che possono predire il rischio di cGVHD, poiché potrebbero svilupparsi anticorpi anti Y in caso di disparità di sesso o per la maggior immunizzazione delle donatrici sane multipare.

La fonte di cellule staminali. La cGVHD insorta dopo un trapianto di cellule staminali da sangue periferico (PBSCT) può rispondere meno alle terapie rispetto ai trapianti da midollo osseo (BMT) [Pérez-Simón JA, et al. Drugs 2006].

La composizione del trapianto in cellule T e in cellule CD34+ è considerata come fattore che può influenzare il rischio di cGVHD. L'infusione di un numero elevato di progenitori è stata correlata con una maggior incidenza di cGVHD estesa nei pazienti ricevente PBSCT sia nel caso di regime di condizionamento ad intensità ridotta (RIC) che di regime mieloablativo [Pérez-Simón JA, et al. Drugs 2006].

Il regime di condizionamento: L'intensità del regime di condizionamento influenza l'incidenza e caratteristiche della GVHD acuta come è stato dimostrato nei trapianti non mieloablativi o RIC. Pertanto, l'uso di un condizionamento RIC può anche aver un impatto sulla GVHD cronica [Pérez-Simón JA, et al. Drugs 2006].

Finalmente, l'**aGVHD** è uno dei maggiori predittori di cGVHD e il 70-80% dei pazienti con aGVHD di grado II-IV svilupperanno la forma cronica (cGVHD) [Pavletic S, et al. Blood. 2005], inoltre la presenza di GVHD acuta pregressa è per GVHD cronica [Lee S, et al, blood 2002].

I.5. Il chimerismo

I.5.1. Definizioni

Il termine chimerismo si riferisce alla coesistenza di cellule linfopoietiche di due soggetti diversi a seguito di un trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT).

Per un chimerismo completo si intende una completa sostituzione dell'emopoiesi del ricevente con la linfopoiesi del donatore ($\geq 95\%$ di cellule d'origine del donatore).

Un chimerismo misto indica la presenza sia di cellule del donatore che del ricevente ($< 95\%$ di cellule del donatore) nel sangue periferico o in un dato compartimento cellulare, ad esempio i linfociti. Se il chimerismo presenta una quota di donatore inferiore al 5% si parla di perdita del trapianto o rigetto.

Si definisce "split chimerismo" quando solamente un compartimento cellulare specifico deriva completamente dal donatore [Antin et al. Biol Blood and Marrow Transpl 2001].

La parola microchimerismo indica la presenza minima di cellule del donatore identificabili solo con delle tecniche molto sensibili. Questa entità è stata descritta inizialmente in casi di trapianto di organo e nelle donne affette da sclerosi sistemica in cui possono venir identificate piccole quantità di cellule del feto.

Fin dai primi trapianti, più di 30 anni fa, è stato riconosciuto che determinare il grado con cui il sistema linfopoietico del donatore supera o si equilibra con quello dell'ospite può essere critico per stabilire il successo della procedura.

In più tale determinazione aiuta il clinico a valutare l'impatto dei diversi regimi di condizionamento sull'attecchimento, oltre a guidare le decisioni in merito all'immunoterapia post trapianto (vedi tabella 4) [Antin JH, et al. Biol Blood and Marrow Transplantation, 2001].

Type of Chimerism	Working Definition	Comment
Full chimerism	100% Donor cells detected	Full chimerism implies complete lymphohematopoietic replacement, although most assays are semiquantitative and small numbers of host cells may be undetected.
Mixed chimerism	Host cells are detected in a given cellular compartment, lymphocytes	The literature often lists 5% or 10% donor cells as a criterion for mixed chimerism. We have avoided using a number here, because the sensitivity of measurement techniques varies, and the implication of chimerism depends on the disease and the compartment. In general, any reliable detection of host lymphohematopoietic cells can be considered mixed chimerism.
Split chimerism	One or more whole lineage is host and one or more whole host lineage is donor	The details of the split chimerism should be clear, eg, myeloid cells are 100% host and T cells are 100% donor.
Microchimerism	<1% Host cells detected	Microchimerism has primarily been described using highly sensitive techniques in organ transplantation and to evaluate systemic sclerosis. We do not recommend its use after allogeneic stem cell transplantation.

Tabella 4 : Definizione del chimerismo [Antin JH, et al. Biol Blood and Marrow Transplantation, 2001]

I.3.2.2. Tecniche di analisi del chimerismo

L'analisi del chimerismo può essere eseguita su campioni di sangue midollare o sangue periferico intero o frazionato [Apperley J, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008]. I tipi di metodiche sono estremamente varie e spaziano dall'immunofenotipo delle emazie, all'analisi isotopica delle Ig fino alle analisi citogenetiche molecolari.

Ogni metodica ha i suoi limiti e vanno pertanto scelte in relazione agli intenti voluti (vedi tabella 5).

METODICA	VANTAGGI	SVANTAGGI	SENSIB. (%)	APPLICABILITA'
Citogenetica		tempi lunghi di esecuzione	5	Bassa
X/Y FISH	Pochi FP, sensibile	Limitato a TMO sex-mismatched	0.1	Bassa
Fenotipo emazie	Semplice, accurato	A lunga latenza, linea specifico	1-5	Alta
RFLP	Alta informatività	tempi lunghi di esecuzione; laboriosa	5-10	Alta
STR-PCR	Veloce, affidabile, altamente quantitativo	Moderata sensibilità	1-5	Molto alta
STR in sottopop.	Sensibilità molto alta	Laborioso, costoso	0.1-0.001	Molto alta
Real-time PCR	Alta sensibilità, rapido	FP in SNPs, alta spec. in PCR Y-specifica	0.001-0.0001	Medio-alta

Tabella 5: Metodiche di analisi del chimerismo (bader et al. bmt 2005)

I.3.2.2.1. Fluorescent in situ hybridization (XY-FISH)

La tecnica appartiene all'ambito delle metodiche citogenetiche e consiste nell'ibridazione di preparati all'interfase con due probe marcati con colori diversi, uno per il cromosoma X e uno per l'Y. Un marcatore distingue cellule del donatore da quelle del ricevente, come la presenza del cromosoma Y nei trapianti da donatori di sesso opposto. Tuttavia, gli studi di chimerismo usando le analisi citogenetiche sono compromesse dalla bassa sensibilità ed il bisogno di dividere le cellule. L'uso dell'analisi di *in situ hybridization* (FISH) ha aumentato la sensibilità ed ha eliminato il bisogno di dividere le cellule però può esser applicata solo nel caso di trapianti di sesso discordante [Apperley J, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

I.3.2.2.2. Tecniche basate sul DNA:

Le tecniche di Southern blotting usando sia una singola copia sia delle sonde dei minisatelliti sono state usate inizialmente usati per valutare il chimerismo post-trapianto. Tali tecniche consentono virtualmente la valutazione di tutti i trapianti allogeneici, ma sono limitate da una relativa mancanza di sensibilità e da una notevole complessità della tecnica stessa. Pertanto non sono molto applicate [Apperley J, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008].

Le tecniche basate sulla PCR permettono invece di analizzare dei polimorfismi nella lunghezza degli amplificati.

Storicamente, l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (RFLP) hanno permesso di distinguere le cellule del donatore da quelle del ricevente con precisione. Questi polimorfismi sono delle variazioni neutrali nella sequenza del DNA create sia

per la perdita sia per l'acquisizione di siti di clivaggio di enzimi di restrizione o dall'inserzione del DNA tra siti di restrizione.

Successivamente, questa metodica affidabile, ma laboriosa, è stata superata dall'analisi dei micro satelliti VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) e STR (Short Tandem Repeats) in cui loci trasmessi in modo mendeliana. I VNTRs sono motivi di DNA ripetuti con un segmento centrale di lunghezza che varia da 10-100 bp mentre gli STRs (Short Tandem Repeats) consistono in ripetizioni di 2-6 bp.

Sia i VNTRs che gli STRs possono essere amplificati per permettere l'analisi delle differenze di lunghezza tra cellule del donatore e del ricevente in PCR. Tuttavia, l'approccio il più estesamente usato coinvolge la PCR degli STR [Thiede C, et al. *Acta Haematologica*, 2004].

I.3.2.2.3. La PCR

L'introduzione della Polymerase Chain Reaction (PCR) come metodica per una rapida amplificazione delle regioni di microsatelliti e minisatelliti umani ha fornito un potente strumento per valutare il chimerismo. Utilizzando dei primers o oligonucleotidi di innesco, l'allele viene amplificato e, quindi, il prodotto della PCR viene separato secondo la lunghezza del frammento determinato dal numero di tandem repeats.

In generale, l'analisi dei microsatelliti (STRs) è più semplice dell'analisi dei minisatelliti (VNTRs). Questa differenza è in parte dovuta al fatto che gli alleli dei minisatelliti sono più lunghi di quelli dei microsatelliti.

Il principale vantaggio di una metodica basata sulla PCR è la miglior sensibilità che permette la rivelazione di popolazioni minori di cellule del donatore o del ricevente.

In conclusione, la PCR permette l'identificazione di un piccolo numero di cellule, permettendo quindi l'analisi della cinetica di attecchimento prima di un'evidenza morfologica di attecchimento. Il prodotto della PCR viene analizzato con elettroforesi su gel d'agarosio, ibridizzato con delle sonde ^{32}P -marcate e autoradiografato, oppure la PCR può essere condotta con dei primers fluorescentemente marcati e poi il prodotto della PCR può venir visualizzato usando un sequenziatore, esempio ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I.3.2.2.4. Short Tandem Repeats (STRs)

È la metodica attualmente più utilizzata per valutare il chimerismo. Il vantaggio, rispetto alla FISH, è l'alta informatività. Possono essere usati virtualmente per tutte le coppie donatore-ricevente ed è richiesto solo un piccolo numero di cellule (<1000) in quanto poi si procede con l'amplificazione tramite PCR [Thiede C, et al. *Acta Haematologica*, 2004]. La sensibilità non è molto alta, nel range dell'1-5% contro lo 0,1-2% della FISH, ma riveste un importante significato clinico. Può predire imminenti ricadute specie se si valuta sulla popolazione di interesse ad esempio tramite una selezione immunomagnetica.

Gli STRs presentano un grande numero di alleli e permettono un'alta probabilità statistica che ci siano loci significativi fra il profilo di un soggetto e quello di un altro (vedi tabelle 6a e 6b).

Locus Designation	Chromosome Location	Alleles Included in Identifier Allelic Ladder	Dye Label	Control DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM	13 ^a
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30 ^b
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11 ^c
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		19, 23

Tabella 6a : Loci amplificati

Locus Designation	Chromosome Location	Alleles Included in Identifier Allelic Ladder	Dye Label	Control DNA 9947A
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED	14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8 ^d
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET	X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11 ^a
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24

tabella 6b: Loci amplificati

1.5.3. Esito del chimerismo

Se l'amplificato viene analizzato su un sequenziatore automatico, si può ricavare anche una valutazione semiquantitativa attendibile.

Viene espresso come ratio tra donatore e ricevente e può variare da 0 a 100% di donatore.

Si considerano le aree dei picchi informativi, differenti da donatore a ricevente in post-trapianto. A partire dall'area del picco viene stimata la percentuale di chimerismo sulla base della seguente formula:

$$(D1 + D2 / D1 + D2 + R1 + R2) \times 100$$

dove D1 e D2 sono le aree degli alleli del donatore mentre R1 e R2 quelle del ricevente [Thiede C, et al. Bone Marrow Transplantation, 1999].

Nel caso di chimerismo misto (vedi figura 3) :

1- il ricevente e il donatore sono omozigoti o eterozigoti e non hanno nessun allele in comune (figura .1) :

$$\% \text{ donor} = 100 \times (\text{area C} + \text{area D}) / [(\text{area A} + \text{area B}) + (\text{area C} + \text{area D})]$$

2- il ricevente e il donatore sono eterozigoti e hanno un allele in comune (figura .2):

$$\% \text{ donor} = 100 \times \text{area C} / (\text{area A} + \text{area C})$$

3- il donatore (o il ricevente) è eterozigote e un allele è identico a quello del pattern del ricevente (o donatore) che è omozigote (figura .3):

$$\% \text{ donor} = 100 \times \text{area B} / [(\text{area A} - \text{area B})/2 + \text{area B}]$$

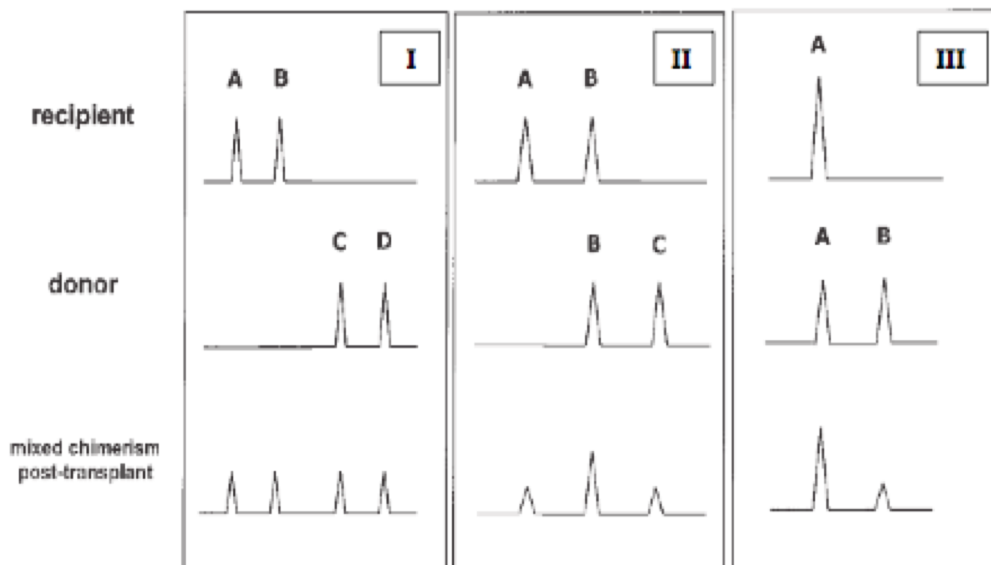


Figura 3: Rappresentazione schematica di diverse configurazioni donatore-ricevente [Thiede C, et al. leukemia, 2001]

CAPITOLO II - SCOPO DELLA TESI

La GVHD cronica è una patologia del sistema immunitario caratterizzata da molteplici quadri clinici con manifestazioni di varia gravità, fino al decesso, che colpisce pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche in percentuale variabile dal 10% fino al 70%, secondo i fattori di rischio noti.

Purtroppo non è ancora ben nota la sua patogenesi e molti sono i fattori di rischio coinvolti nella sua insorgenza.

Recentemente, è stato evidenziato un importante ruolo legato alla linfopoiesi B, sia grazie al riscontro di autoanticorpi specifici, sia grazie all'evidenza dell'efficacia di Rituximab in alcuni casi di GVHD cronica.

Lo scopo che si prefigge la mia tesi è primariamente quello di indagare la presenza di possibile correlazione tra i livelli di BAFF sierico e il rischio di sviluppare una GVHD cronica.

Secondariamente, abbiamo cercato una correlazione tra i livelli di BAFF e il numero di linfociti B CD19+ circolanti.

Inoltre, abbiamo studiato il chimerismo B linfocitario post trapianto per osservare il possibile ruolo dell'attecchimento nel contesto del rischio di sviluppare una GVHD di tipo cronica.

CAPITOLO III - MATERIALE E METODI

III.1. Caratteristiche dei pazienti

Si tratta di uno studio prospettico eseguito da giugno 2009 a aprile 2011 su pazienti adulti, ricoverati presso il nostro reparto della Clinica Ematologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine per patologie ematologiche maligne di vario tipo, sottoposti ad un trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche.

Lo studio ha incluso pazienti che hanno ricevuto un regime di condizionamento mieloablato o non mieloablato e trapianti di cellule staminali sia da sangue midollare, sia da sangue periferico mobilizzato, sia da unità cordonale.

Abbiamo valutato un campione di 82 pazienti di cui 51 uomini (il 62,2%) e 31 donne (cioè il 37,8%) da 20 a 69 anni con una media d'età di 48 anni. La maggioranza era anziana. Il 53% (44 pazienti) aveva un'età pari o maggiore a 50 anni (vedi figura 4).

Trentacinque pazienti (cioè il 43%) sono stati ricoverati per leucemie acute mieloidi (24 casi) che linfoblastica (7 casi di leucemia acuta linfoide B e 2 casi di leucemia acuta linfoide T) e sindrome mielodisplastica (2 casi); 22 (il 27%) per linfomi di Hodgkin e non Hodgkin, 14 pazienti (il 17%) per mieloma multiplo; 5 (il 6%) per leucemia linfatica cronica di tipo B e 6 per altre emopatie (vedi tabella 7).

Cinquantasette degli ottantadue malati hanno avuto un regime di condizionamento non mieloablato ad intensità ridotta (RIC), mentre 25 hanno ricevuto un condizionamento convenzionale mieloablato. Il tiotepa è stato il farmaco più somministrato nel condizionamento RIC (il 42%) associato alla fludarabina e/o alla ciclofosfamide e/o il melphalan. Il busulfano è stato il secondo più usato in associazione con la fludarabina e/o la ciclofosfamide (nel 31% dei malati). Il 21% dei pazienti hanno ricevuto il melphalan associato alla fludarabina. La Total Body Irradiation (TBI) è stata usata nel 6%. Nel gruppo sottoposto a regime di condizionamento mieloablato, il 53% dei pazienti ha ricevuto ciclofosfamide in associazione con tiotepa o busulfano. La TBI è stata utilizzata nel 21% dei pazienti, altri farmaci quali la fludarabina, associata al busulfano o al treosulfano, è stata somministrata nel 16% dei casi; il melphalan da solo è stato utilizzato nell'11% dei casi.

Venticinque hanno ricevuto delle cellule staminali da un donatore familiare e 57 da donatore da registro (MUD). Trentatré dei trapianti realizzati sono stati effettuati con donatore di sesso differente del paziente contro 49 donatori dello stesso sesso. Le fonti di cellule staminali utilizzate sono state da sangue periferico per 63 pazienti, 16 da sangue midollare, e da unità cordonale per 3 pazienti.

Quarantannove pazienti (il 59,75%) hanno ricevuto il Rituximab, l'anticorpo monoclonale anti-CD20, nel regime di condizionamento oppure entro i primi sei mesi dal trapianto allogenico.

Nei due terzi dei pazienti è stata somministrata l'anti-thymoglobulin T (ATG) per poter diminuire il rischio di GVHD acuta grave e tutti i casi in cui è stata somministrata erano da donatore da registro.

Una GVHD acuta è comparsa in un po' più della metà dei pazienti (42 su 82) tra il nono e l'ottantacinquesimo giorno post-trapianto con una media di insorgenza di 25,44 giorni dal trapianto. Tra questi 42 pazienti, 20 hanno sviluppato solo una GVHD acuta (47,6%) mentre per 22 si è complicata in GVHD cronica (il 52,4%). In totale, quaranta pazienti (il 49 %) hanno sviluppato una GVHD cronica senza (il 21%) o con (il 28%) una GVHD acuta, come abbiamo visto sopra, con un tempo medio dell'esordio di 155 giorni (*range* di 90-300 giorni).

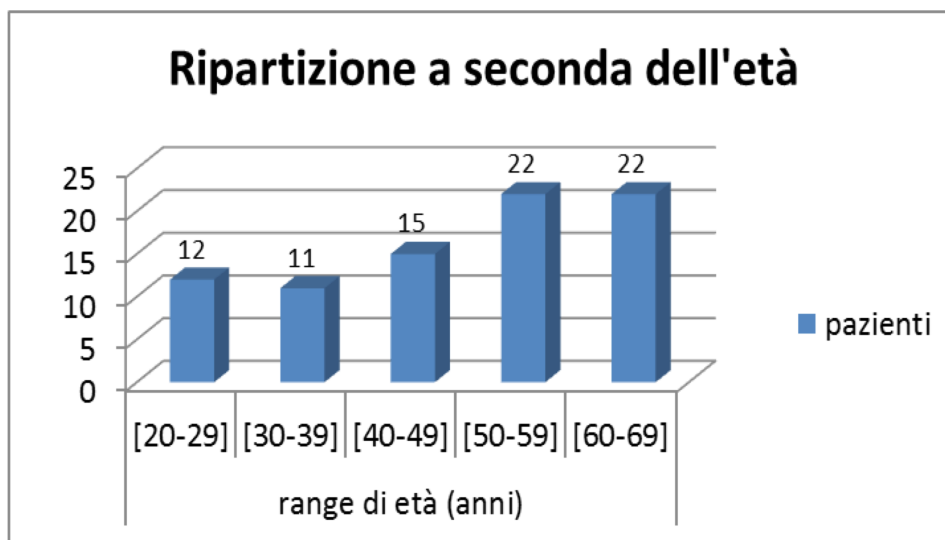


Figura 4: Ripartizione dei pazienti a seconda del range dell'età

Tabella 7 : Caratteristiche dei pazienti	n	%
Pazienti (n)	82	100
Età media (<i>range</i>)	48,4 (20-69)	
M	51	62,2
F	31	37,8
Emopatie		
- LAM/LAL/SMD	35	43
- LAM	24	
- LAL T	2	
- LAL B	7	
- SMD	2	
- LNH e LH	22	27
- Mieloma multiplo	14	17
- LLC B	5	6
- altre	6	7
Tipo di trapianto allogenico		
- Mieloablato	25	30,5
- Non mieloablato	57	69,5
Fonte di cellule staminali		
- Sangue periferico	63	76,8
- Sangue midollare	16	19,5
- Sangue cordonale	3	3,7
Donatore		
- Familiare	25	30,5
- MUD	57	69,5
- Di sesso differente	33	40
- Stesso sesso	49	60
Uso Rituximab (condizionamento o nei 6 mesi post-trapianto)		
- Si	49	59,7
- No	33	40,3
Uso ATG		
- Si	55	67,1
- No	27	32,9
GVHD acuta	42	24
- Solo aGVHD	20	47,6
- Associata a cGVHD	22	52,4
Tempo medio esordio (gg)(<i>range</i>)	25,44 (9-85)	
GVHD cronica		
- Si	40	49
Con antecedenti di aGVHD	23	28
Senza aGVHD precedente	17	21
- Tempo medio di esordio (gg) (<i>range</i>)	155 (90-300)	
No GVHD acuta né cronica	22	27

III.2. Metodi

III.2.1. Il chimerismo emopoietico post trapianto

III.2.1.1. Preparazione dei campioni

Sono stati prelevati dei campioni di sangue intero periferico nei seguenti tempi: pre-trapianto (-7 giorni) e +90 giorni (gg), +120 gg, +180 gg post-trapianto in provette con EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) per la valutazione del chimerismo su sangue periferico intero, frazione granulocitaria, frazioni linfocitarie T CD3+ e B CD19+.

Le provette di sangue periferico intero sono state congelate subito a -20°C in attesa dell'estrazione del DNA. Per ottenere le frazioni cellulari suddette, il resto del sangue periferico intero è stato separato su gradiente FICOLL-HISTOPAQUE per separare le cellule mononucleate dai granulociti grazie ad una centrifugazione a 1600 rpm per 20 minuti. Successivamente, ogni tipo di cellule è stato raccolto. I granulociti sono stati congelati subito a -20°C dopo aver verificato la loro purezza all'emocromocitometro (strumento LH 750, BeckmanCoulter®). Per ottenere la frazione linfocitaria, la frazione mononucleata ottenuta con il ficoll è stata incubata con le opportune biglie (Milteniy®) secondo le istruzioni della ditta, cioè con incubazione a +4°Celsius per 15 minuti con 20 µL di reagente per ogni 10 milioni di cellule in modo da poter marcare le cellule B CD19+ e isolarle con un principio immunomagnetico. Successivamente, la frazione B linfocitaria isolata è stata incubata a +4°Celsius, per 7 minuti con 10 µL di soluzione anticorpale anti-CD3+ o anti-CD19+ per ogni 10 milioni di cellule, poi lavata con 5 mL di soluzione di running buffer e centrifugata per 4 minuti a 1900 rpm. Dopo l'eliminazione del surnatante, sono aggiunti 500 µL di running buffer ed è stata avviata la procedura sul separatore cellulare automatico AutoMacs® (Milteniy®).

La purezza dei linfociti marcati è stata verificata in seguito in citofluorimetria su Facscalibur (Becton-Dickinson®) e sono stati registrati mille eventi.

III.2.1.2. Estrazione del DNA

Le provette di sangue del donatore e del ricevente pre trapianto (basale) spesso iper o normocellulate sono state manipolate con il Puregene Blood Core kit di QIAGEN®, mentre i campioni di DNA raccolti post-trapianto sono stati estratti su colonnine secondo le istruzioni del QIAamp DNA Blood Mini kit di QIAGEN®.

III.2.1.2.1. Estrazione con Puregene Blood Core kit

Si deve lavorare con una cellularità totale del materiale biologico compresa tra 19×10^6 - 30×10^6 elementi.

- In una provetta da 15 mL, si dispensano 3 volumi soluzione di lisi dei globuli rossi per 1 volume di sangue scongelato da usare;
- si mescola per inversione e si incuba a temperatura ambiente (15-25°C) per 10 minuti e successivamente si centrifuga per 10 minuti a 3100 rpm.
- Il surnatante è attentamente eliminato con una pipetta-pasteur per conservare il pellet cellulare che verrà rotto con l'aiuto del vortex.
- Vengono aggiunti tra 3 e 5 ml (seconda la conta cellulare) di soluzione per lisare i globuli bianchi e le cellule vengono rotte meccanicamente con una pipetta-pasteur fino ad omogeneizzazione della soluzione.
- Tra 15 e 20 µL di RNasi sono aggiunti alla soluzione che è in seguito agitata per inversione (25 volte) e incubate poi a 37°C per 15 minuti.
- Successivamente, si porta la provetta a + 4°C e si aggiunge 1 ml di soluzione per precipitare le proteine (Protein precipitation solution) e si mescola con il vortex per formare dei frustoli di proteine
- Si centrifuga per 10 minuti a 3100 rpm
- Il surnatante ottenuto viene prelevato e unito a 3 ml d'isopropanolo precedentemente dispensati in una provetta da 15 ml (si deve formare un sottile filamento bianco, chiamato medusa di DNA per inversione della provetta)
- Dopo centrifugazione a 3100 rpm per 3 minuti, si elimina l'isopropanolo per inversione della provetta e il filamento di DNA viene risospeso in 3 ml d'etanolo a 70%
- Dopo centrifugazione per 2 minuti a 3100 rpm, l'etanolo a 70% è eliminato con una pipetta-pasteur
- L'etanolo rimanente viene eliminato per evaporazione e il pellet viene poi risospeso in 200 µL di soluzione d'idratazione in temperatura ambiente.

III.2.1.2.2. Estrazione con QiAamp DNA Blood Mini Kit

III.2.1.2.2.1. Principi e procedura

Il kit è disegnato per una rapida purificazione di una media di 6 µg di DNA totale da 200 µL di sangue umano intero, oppure da 6×10^6 linfociti, e più di 50 µg di DNA da 200 µL di sangue concentrato da buffy coat. La procedura è appropriata per l'uso di sangue intero trattato con citrato, eparina o EDTA, linfociti, plasma, siero e liquidi biologici. I campioni possono essere trattati immediatamente o essere prima congelati.

Il kit utilizza il principio del legame del DNA a membrane di silice poste nelle colonnine e purificato grazie a successivi lavaggi di buffers salini.

III.2.1.2.2. Estrazione manuale

Questo metodo si usa per i campioni ipocellulati (meno di 6000 cellule/ μL). Si lavora con 400 μL di materiale biologico, tranne per i campioni di linfociti (200 μL), in provette da 2 mL.

Comprende le seguenti tappe:

- Lisi della membrana cellulare con 40 μL di proteasi se usiamo 400 μL di materiale o 20 μL per 200 μL di materiale usato.
- Sono aggiunti i 200 μL o 400 μL di materiale biologico
- 200 μL o 400 μL di soluzione di buffer AL a secondo del materiale iniziale usato
- Si mescola al vortex per 15 secondi,
- Si Incuba per 10 minuti a 57° Celsius in bagno termostatico,
- Centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto in microcentrifuga Eppendorf 5415 R®
- Sono aggiunti 400 μL di alcool assoluto per 400 μL di materiale usato e la metà per 200 μL di linfociti
- Mescolare al vortex per 15 secondi
- Le provette sono centrifugate a 10 000 rpm per qualche secondo

Da questo punto si lavora sulle colonnine:

- Trasferimento della soluzione (proteasi + cellule + buffer AL + alcool assoluto) nelle colonnine
- Si centrifuga per 1 minuto a 13 000 rpm. Questa tappa provoca il passaggio del contenuto della colonnina attraverso la membrana di silice, che sarà poi lavata più volte.
- Lavaggio con 500 μL di soluzione di buffer AW1 in centrifuga per 1 minuto a 8000 rpm
- Lavaggio con 500 μL di soluzione di buffer AW2 per 3 minuti a 13 000 rpm

I buffer AW1 e AW2 migliorano considerabilmente la purezza del DNA eluito. Le condizioni di lavaggio assicurano una completa rimozione dei residui contaminanti senza compromettere il legame del DNA alla membrana.

- Il DNA purificato e asciutto è eluito dalla colonnina in una forma concentrata con 200 μL di buffer AE, seguito da un' eventuale incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti e poi da una centrifugazione (8000 rpm per 1 minuto)

La soluzione raccolta nella provetta Eppendorf è subito storta a +4°Celsius fino alla quantificazione del DNA.

III.2.1.2.3. Estrazione automatica con QIAcube

Si lavora sullo strumento automatico con 200 μL di tutti campioni con una cellularità uguale o superiore a 6000/ μL . Si usano la stessa metodica e gli stessi reagenti (proteasi, alcool assoluto, buffer AL, AW1, AW2 e AE) previsti per l'estrazione a mano del mini kit; alla differenza solo che le quantità di proteasi e di alcool assoluto usati sono fissate rispettivamente a 20 μL e 200 μL .

III.2.1.2.3. Quantificazione del DNA

Viene eseguita sullo spettrofotometro (GeneQuant pro[®], Amersham Biosciences) dopo delle diluizioni di 1:10 di volume di DNA (pari a 10 μL di DNA-madre per 90 μL di acqua sterile distillata) nel caso di estrazione con il Puregene Core kit ; e 1:2 di DNA (pari a 40 μL di DNA-madre per 40 μL di acqua distillata) in caso di estrazione dal mini kit di QIAGEN[®] sia a mano che dal QIAcube.

La concentrazione del DNA è ottenuta secondo la formula:

$$\text{lunghezza d'onda } \lambda_{260} \times 50 \times \text{fattore di diluizione}$$

il fattore di diluizione è 10 per l'estrazione con il kit grande e 2 per quella con il mini kit.

La purezza del DNA deve essere compresa tra 1,9 e 2,1 del rapporto $\lambda_{260}/\lambda_{280}$.

III.2.1.2.4. PCR

È stato usato il kit AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems[®]). Prima vengono preparate delle diluizioni di DNA con lo scopo di ottenere una concentrazione finale di 1 ng di DNA in un volume massimo di 10 μL .

Si amplifica le 16 regioni di DNA che è il multiplex e che ci sono i primers fluorescenti.

Si lavora sotto cappa sterile. Si usano i reagenti seguenti :

Mix:	10.5 μL x numero di campioni
Primers :	5.5 μL x numero di campioni
Buffer TE :	9 μL x numero di campioni
TaqPolimerasi:	0.5 μL x numero di campioni

Dalla somma dei volumi dei reagenti usati si ottiene un volume totale T μL di master Mix.

Poi, si dispensa in ogni micro-provetta 24 μL del master Mix. Fuori dalla cappa, si dispensa 1 μL di DNA diluito a 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ nella sua micro-provetta corrispondente e le provette sono messe nel termociclatore.

Il buffer TE è una soluzione d'idratazione del DNA.
Usiamo la Taq Polimerasi del tipo Amplitaq® Gold.

La PCR è caratterizzata da tre step.

- ⤴ Dapprima il materiale genetico viene denaturato generalmente a temperature intorno ai 90-96°C, in questo caso a 94°C.
- ⤴ Il secondo step prevede l'annealing dove i primers si legano alle sequenze complementari del single strand. La temperatura varia a seconda dei protocolli da 35-60°C; in questo protocollo è a 59°C.
- ⤴ Infine si ha l'estensione a partire dai primers attraverso l'aggiunta di nucleotidi da parte della polimerasi (la Taq polimerasi lavora a 72°C).

Questi tre step vengono ripetuti per n cicli a seconda del protocollo (il nostro protocollo prevede 28 cicli); il tutto si estrinseca in tre fasi ovvero quella esponenziale dove i prodotti si accumulano, lineare dove le componenti della reazione iniziano ad essere consumate e infine il plateau dove la reazione è finita per esaurimento dei reagenti e si procede così all'analisi su gel di agarosio.

III.2.1.2.5. Elettroforesi capillare

Per poter fare correre i nostri prodotti di amplificazione da PCR sull'elettroforesi, si deve prima denaturare il DNA con uno shock termico un composto di Hi Di Formammide (o formaldeide ad alta purezza) e Liz® Applied Biosystems®.

L'Hi-Di Formammide permette al DNA di mantenersi in single strand per 48 ore, mentre la Liz® è il nostro peso molecolare.

Sotto cappa si prepara la seguente mix:

Hi-Di :	24 μL x numero di campioni +1 + la provetta per il Ladder
Liz:	0.5 μL x numero di campioni +1 + la provetta per il Ladder

Dalla mix ottenuta si dispensa 24 μL in ogni provetta numerata. Dopo di che si aggiunge 1.5 μL di ladder (è una scala di riferimento contenente tutti i possibili amplificati) nella sua provetta e 0.5 μL di prodotti di PCR nelle provette corrispondenti. Segue la fase di denaturazione del DNA a 94°C per 3 minuti e poi il campione viene posto in ghiaccio fino al caricamento sullo strumento.

I primers sono marcati con fluorocromi diversi e possono essere visualizzati facendo correre i prodotti in un sequenziatore automatico di DNA, come l'ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) in cui viene applicata una differenza di potenziale al capillare grazie alla presenza di un catodo e un anodo alle due estremità.

L'elettroforesi capillare permette di separare i frammenti e la loro lunghezza ed intensità di fluorescenza vengono valutati da un software che permette di visualizzare i picchi (elettroforetogramma) (vedi figura 5).

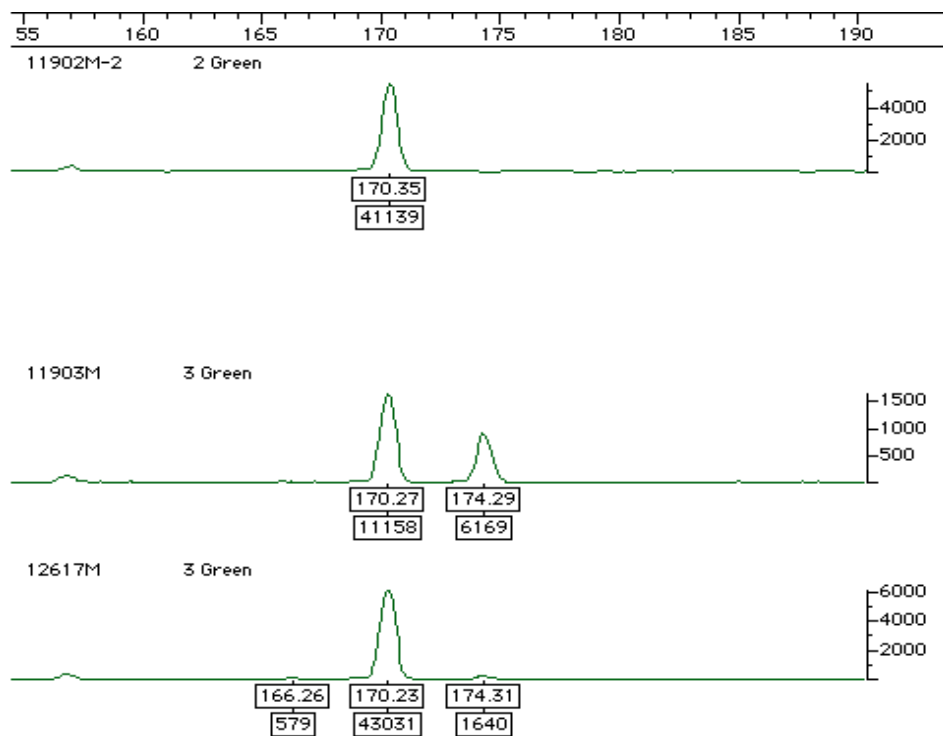


Figura 5: esempio di elettroforetogramma

III.2.2. Analisi del BAFF:

L'analisi del BAFF è stata eseguita su campioni di siero dei pazienti, raccolti a -7 giorni (pre-trapianto) e post-trapianto a +90gg, +120gg, +180gg, con il kit d'immunoassay ELISA (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, USA).

Il metodo usa la tecnica quantitativa in sandwich d'immunoassay.

- I pozzetti della micropiastra sono pre-rivestiti da un anticorpo monoclonale specifico per il BAFF;
- 100 µl di Assay Diluent RD1-72 e poi 50 µl di soluzione Standard, o di controllo sono aggiunti;
- poi i campioni vengono dispensati nei pozzetti

- si incuba dalla piastra a temperatura ambiente per 2 ore, in modo che il BAFF presente venga legato all'anticorpo immobilizzato.
- Si effettuano 4 successivi lavaggi con 400 µl di wash buffer in ogni pozzetto per eliminare le sostanze non legate.
- Poi, si inoculano in ogni pozzetto 200 µl di BAFF/Blys coniugato, un anticorpo policlonale legato all'enzima specifico per il BAFF
- Si incuba per altre 2 ore a temperatura ambiente.
- Una seconda fase di 4 lavaggi è eseguita per rimuovere il reagente anticorpo-enzima non legato
- Vengono aggiunti 200 µl di una soluzione-sostrato ai pozzetti e si sviluppa un colore in proporzione alla quantità di BAFF presente e legato nella tappa iniziale (passa dal blu al giallo).
- Lo sviluppo del colore viene fermato con 50 µl di Stop Solution per pozzetto. A questo punto, l'intensità del colore è stata misurata immediatamente allo spettrofotometro.
- Allo spettrofotometro vengono determinate le assorbanze di ogni pozzetto nei 30 minuti a una lunghezza d'onda di 450 nm, previa sottrazione del bianco, cioè l'assorbanza presente in un pozzetto contenente tutti i reattivi tranne il campione.

III.2.3. Analisi in citofluorimetria

Il sangue periferico intero del ricevente è stato analizzato in citofluorimetria usando il FACSCanto II (Becton-Dickinson®) agli stessi tempi di analisi del BAFF e chimerismo, per osservare l'andamento della ricostituzione B cellulare e l'evoluzione citofluorimetrica della malattia.

Almeno 1 milione di cellule viene messo in incubazione con gli anticorpi specifici per un quarto d'ora a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule in seguito vengono lisate con una soluzione lisante in altri 10 minuti di incubazione. Si eseguono poi due lavaggi a 1900 rpm per 4 minuti. La provetta è pronta per essere letta immediatamente al citofluorimetro.

III.2.4. Analisi statistiche:

L'analisi e la presentazione dei dati sono state eseguite con il software Microsoft Excel 2010.

I test statistici erano:

- Il test del t di Student per comparare le medie
- Chi² per comparare le variabili qualitative

CAPITOLO IV – RISULTATI

IV.1. Incidenza della Graft-versus-Host-Disease cronica

Quaranta su 82 pazienti (49%) hanno sviluppato una GVHD cronica. Tra questi, 23 avevano sviluppato una precedente GVHD acuta. In media, l'esordio è avvenuto a 155 giorni dal trapianto con un range tra 90 e 300 giorni. Nel 37.5% dei casi (15/40) sono stati colpiti due organi, pari ad una cGVHD severa in accordo con l'Organ Scoring System, mentre il 25% dei casi ha presentato una cGVHD moderata e il 37.5% lieve.

Tra i 42 soggetti che non hanno sviluppato la GVHD cronica, 20 pazienti (24%) hanno manifestato la GVHD acuta senza comparsa nel tempo della forma cronica. E ventidue pazienti (27%) non hanno sviluppato nessuna delle due forme di malattia del trapianto contro l'ospite (vedi figura 6).

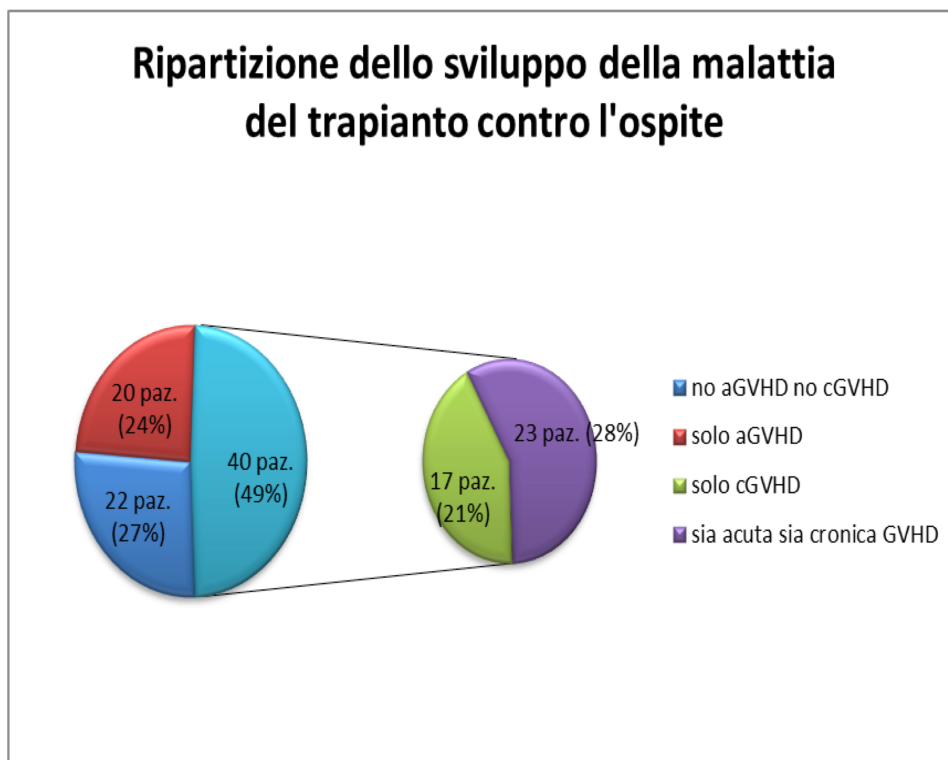


Figura 6: Ripartizione dello sviluppo della GVHD

IV.2. Ricostituzione della linfopoiesi B

E' stata valutata la quota B linfocitaria circolante dal pre-trapianto e fino a 6 mesi dopo la reinfusione delle cellule staminali emopoietiche allogeniche.

La quota linfocitaria totale ha mostrato un marcato decremento al terzo mese post trapianto soprattutto nel gruppo cGVHD positivo. Successivamente il livello dei linfociti circolanti totali è progressivamente aumentato con andamento parallelo fino al 4° mese in entrambi i gruppi in oggetto di studio. Dal sesto mese abbiamo osservato una tendenza differente nei soggetti con GVHD cronica rispetto all'altro gruppo, caratterizzata da un arresto nella crescita della quota linfocitaria periferica (vedi figura 7).

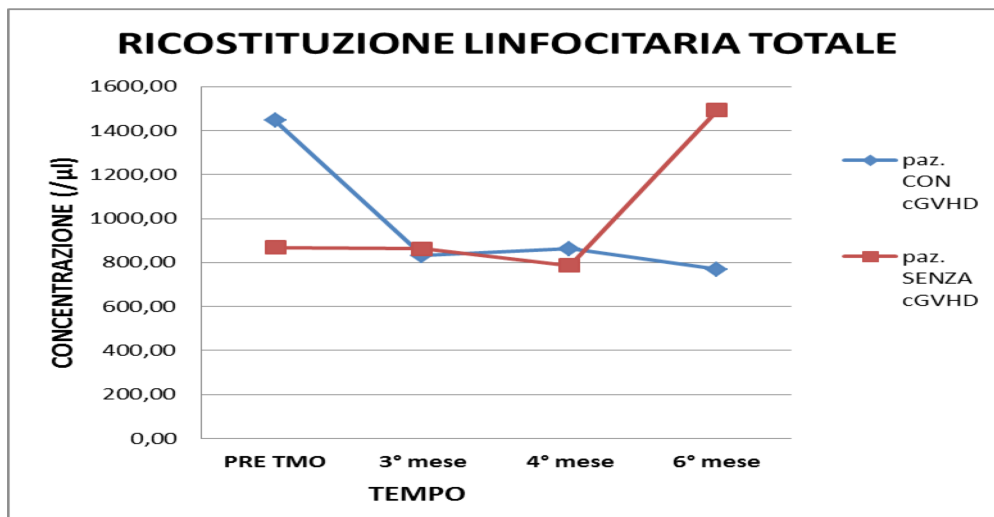


Figura 7: Ricostituzione linfocitaria dal trapianto – Confronti tra il gruppo di pazienti con cGVHD e il gruppo senza sviluppo di GHVD cronica

Per quanto riguarda la quota di linfociti B circolanti, essa si è marcatamente ridotta in entrambi i gruppi di pazienti dopo il trapianto, indipendentemente dalla somministrazione di Rituximab (in pre-trapianto $p=0,35$; a 3 mesi $p=0,76$; a 4 mesi $p=0,92$; a 6 mesi $p=0,85$) , anche se nel gruppo sottoposto a Rituximab la frazione CD19+ ha mostrato valori medi lievemente inferiori all'altro gruppo, seppur senza significatività statistica ((vedi figura 8).

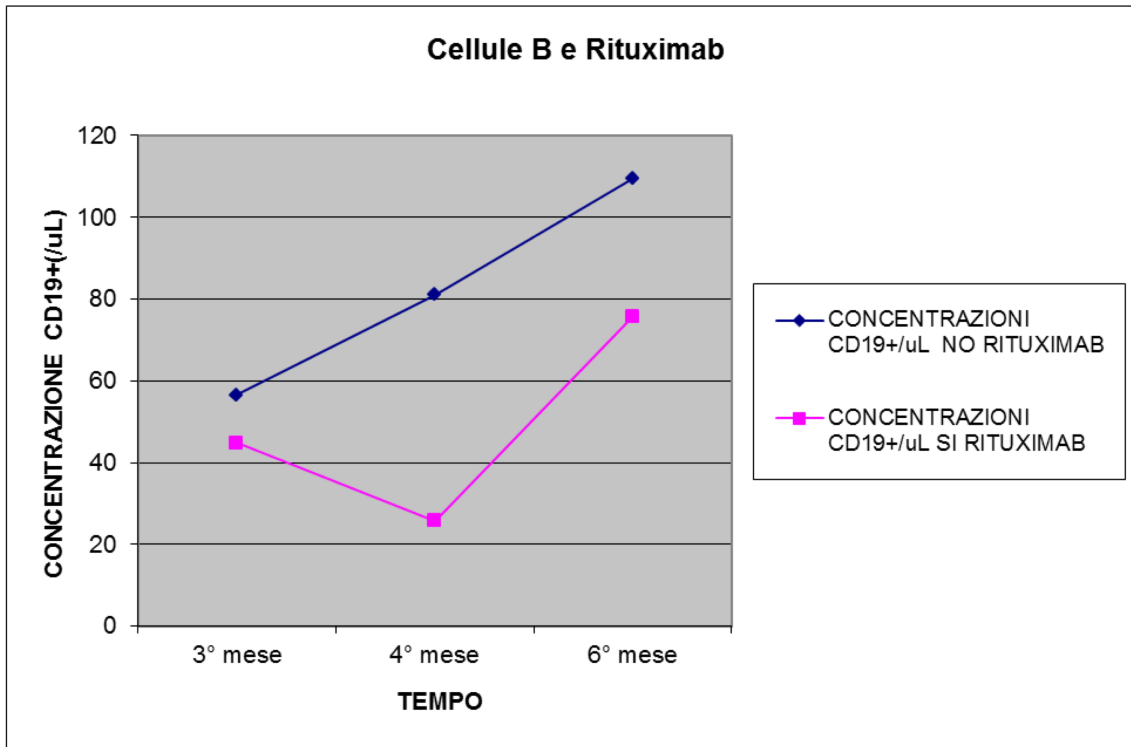


Figura 8: Ricostituzione linfocitaria B e Rituximab negli 82 casi, indipendentemente dalla diagnosi di GVHD cronica

Suddividendo i pazienti secondo la diagnosi di GVHD cronica, alla determinazione precedente all'inizio del condizionamento, il gruppo che svilupperà la GvHD cronica presentava una conta media di 485,1/ μ l di CD19+, mentre il gruppo negativo per GvHD cronica riportava un valore di CD19+ più basso, pari a 42,6/ μ l, senza rilevanza statistica ($p=0,23$ a -7 giorni, $p=0,13$ a 3 mesi; $p=0,96$ a 4 mesi e $p=0,40$ a 6 mesi) (vedi figura 9).

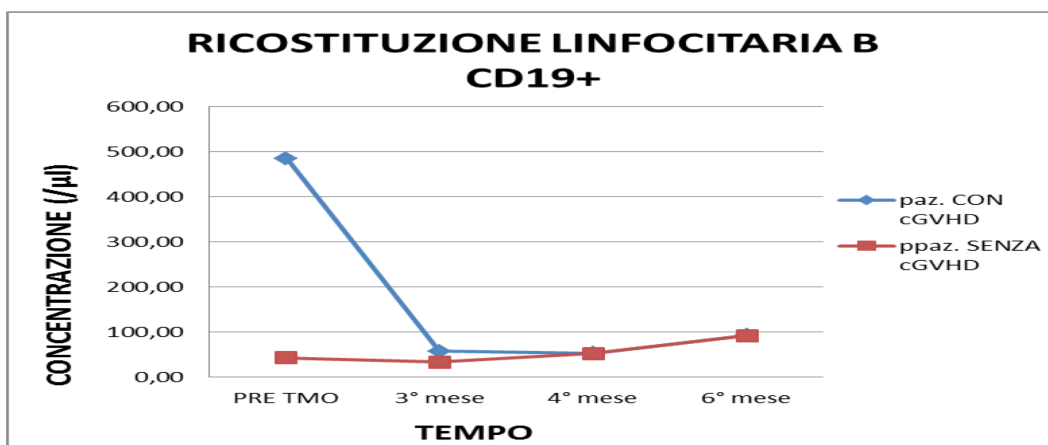


Figura 9: Ricostituzione della frazione linfocitaria B CD19+ in post-trapianto- Confronti tra il gruppo con cGVHD e il gruppo senza cGVHD

Successivamente i pazienti hanno sviluppato e mantenuto una profonda linfopenia B cellulare in modo costante e con andamento parallelo nei primi 4 mesi dal trapianto. Al sesto mese abbiamo potuto osservare un incremento della quota CD19+ in entrambi i gruppi (92,5/ μ l nella coorte positiva e 92,1/ μ l nella coorte negativa).

Abbiamo poi studiato più dettagliatamente un sottogruppo di 22 pazienti, dove l'andamento della ricostituzione B cellulare è stato analizzato puntualmente a -7 giorni, +90, +120, +180 giorni dal trapianto insieme alla concentrazione del BAFF sierico e al chimerismo B linfocitario. In questo gruppo, l'andamento della ripopolazione B ha mostrato che la linfopenia si mantiene per i primi 4 mesi, ma il recupero del gruppo senza GVHD pare più rapido al 6° mese, con una concentrazione di CD19+ pari a 141,4/ μ l contro i 61,6/ μ l del con GVHD cronica (vedi figura 10a e figura 10b).

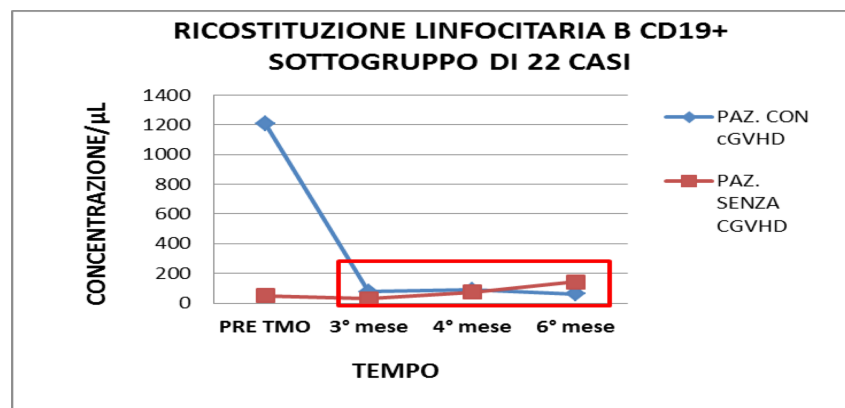


Figura 10a: Ricostituzione B cellulare – sottogruppo di 22 casi

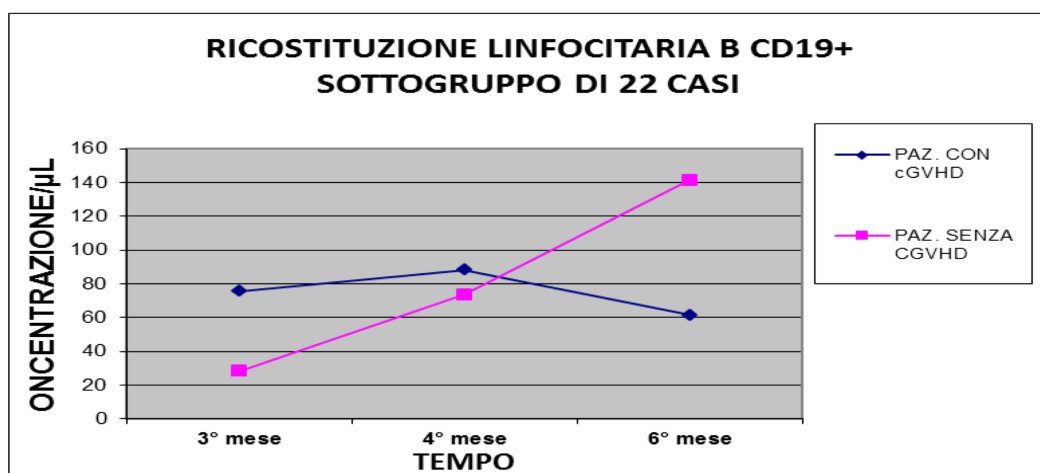


Figura 10b: Ricostituzione B cellulare – sottogruppo di 22 casi - ingrandimento

IV.3. Chimerismo emopoietico post trapianto

Il chimerismo emopoietico è stato testato al 3°, 4° e 6° mese sia sul sangue periferico intero che sulle singole frazioni cellulari di interesse: frazione granulocitaria, frazione CD3+ per valutare il comparto linfoide T e frazione CD19+ per valutare il comparto linfoide B.

Tutti i pazienti della casistica presa in esame hanno attecchito correttamente, presentando una percentuale di donatore maggiore al 90% nel sangue periferico e nella frazione granulocitaria nei 3 primi mesi dalla reinfusione dei progenitori emopoietici. Il gruppo con GVHD cronica ha presentato una percentuale di donatore maggiore rispetto al gruppo senza GVHD ad ogni punto di determinazione, mentre il gruppo senza GVHD cronica ha presentato la persistenza di una quota maggiore di cellule del ricevente (vedi figura 11).

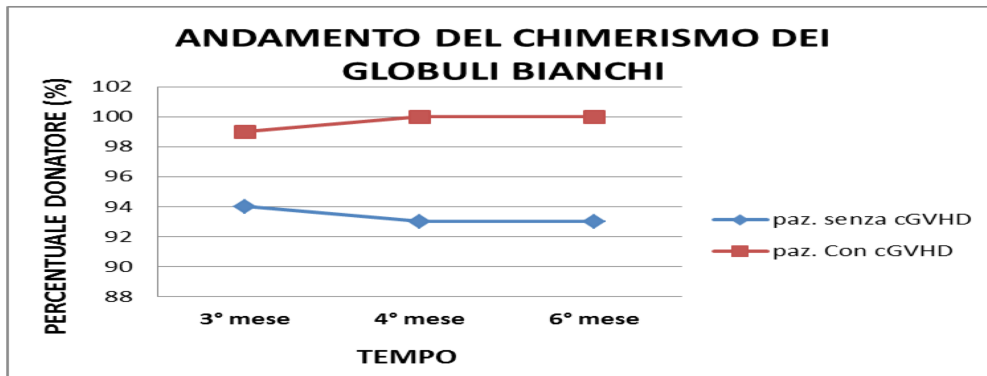


Figura 11: Attecchimento dei globuli bianchi nel sangue periferico intero (medie) - Confronti tra pazienti che hanno sviluppato o non la GVHD cronica

L'analisi del chimerismo della frazione B CD19+ è stata possibile solo in pazienti al 3° mese (12 pazienti) a causa della profonda linfopenia B presente.

Tuttavia, a parte 1 caso di chimerismo misto (pari al 66% di donatore) per una LLC B resistente, la linfopoiesi B è risultata essere costituita al 100% da cellule del donatore in tutti gli altri casi analizzabili nel gruppo con GVHD cronica.

Dal 4° mese in poi, è stato possibile analizzare il chimerismo B linfocitario in quasi tutti i pazienti, e il gruppo con la GVHD cronica ha presentato un chimerismo completo in tutti i casi (vedi figura 12).

In generale, entrambi i gruppi hanno mostrato un attecchimento completo e stabile della linfopoiesi B in tutti i soggetti con un attecchimento completo dei linfociti T e della frazione granulocitaria.

Di fatto, il gruppo con GVHD cronica nella frazione CD19+ ha riportato percentuali di donore sempre maggiori a quello senza GVHD e in quest'ultimo si è assistito ad un calo del valore medio al sesto mese a causa di 2 casi di franca ricaduta ($p=0,93$ a 3 mesi, $p=0,24$ a 4 mesi e $p=0,25$ a 6 mesi).

Anche nel comparto T cellulare, il chimerismo è risultato essere completamente del donatore nei casi che hanno sviluppato GVHD cronica (vedi figura 13) ($p=0,13$ a 3 mesi, $p=0,40$ a 4 mesi; $p=0,07$ a 6 mesi).

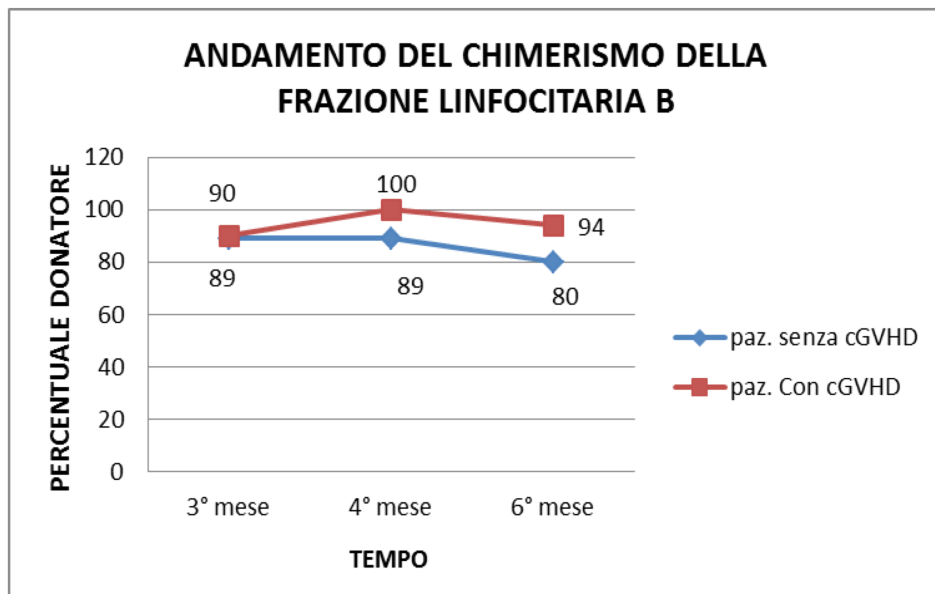


Figura 12: Andamento del chimerismo della frazione linfocitaria B nel gruppo cGVHD positivo rispetto al gruppo negativo (valori medi)

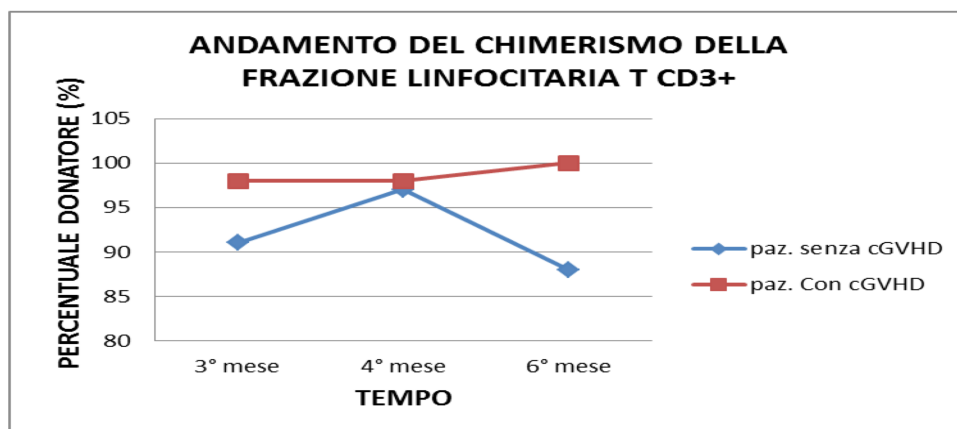


Figura 13: Andamento del chimerismo della frazione linfocitaria T CD3+ e cGVHD (medie)

IV.4. Correlazione tra i livelli sierici di BAFF e la GVHD cronica

All'interno degli 82 pazienti, è stato analizzato il livello di BAFF sierico a -7, +90, +120, +180 giorni. Il gruppo con la cGVHD ha presentato una curva prima in brusca salita con un picco al terzo mese (8,95 ng/ml) seguita da una discesa progressiva nel quarto (7,47 ng/ml) ed il sesto mese (7,44 ng/ml) (vedi figura 14). I pazienti senza GVHD cronica hanno presentato, nel periodo pre-trapianto, dei livelli sierici di BAFF (7,21 ng/ml) superiori a quelli del primo gruppo (5,53 ng/ml) e sono rimasti poi più o meno costanti nei mesi successivi (7,12 ng/ml a 3 mesi e 6,01 ng/ml a 4 mesi) ma sempre inferiori al gruppo che presenta la cGVHD). Al sesto mese tutti i due gruppi ritornano ai livelli iniziali esistenti prima del trapianto: 5,85 ng/ml per il gruppo con cGVHD positivo e 7,44 ng/ml per il gruppo cGVHD negativo. Tuttavia, queste differenze non sono risultate significative ($p=0,68$ a -7 giorni; $p=0,81$ a 3 mesi; $p=0,75$ a 4 mesi e $p=0,33$ a 6 mesi) (vedi figura 14).

Inoltre abbiamo provato a confrontare i livelli sierici di BAFF con la quota di linfociti B CD19+ circolanti. Il rapporto di BAFF/cellule CD19+ è risultato maggiore nel gruppo affetto da cGVHD prima del trapianto (1,8 nel gruppo cGVHD positivo rispetto a 1,02 nel gruppo cGVHD negativo), per poi mostrare un calo al 3° mese (0,85) associato a un transitorio incremento del rapporto nel gruppo GVHD cronica negativo (15,9). Quest'ultimo, probabilmente, è stato causato dall'aumento della citochina e dal concomitante calo dei linfociti circolanti. Successivamente il rapporto misurato nel gruppo cGVHD negativo è calato progressivamente dal 4° mese in poi, mantenendosi sempre minore del rapporto del gruppo cGVHD positivo (0,33 versus 2,03 al quarto mese), di pari passo all'aumentare dei linfociti B circolanti. In particolare, il rapporto a 6 mesi è rimasto inferiore nella coorte cGVHD negativa rispetto a quella positiva (0,14 rispetto 0,15), seppur di poco, verosimilmente in relazione alla più precoce ricostituzione B cellulare del gruppo senza cGVHD.

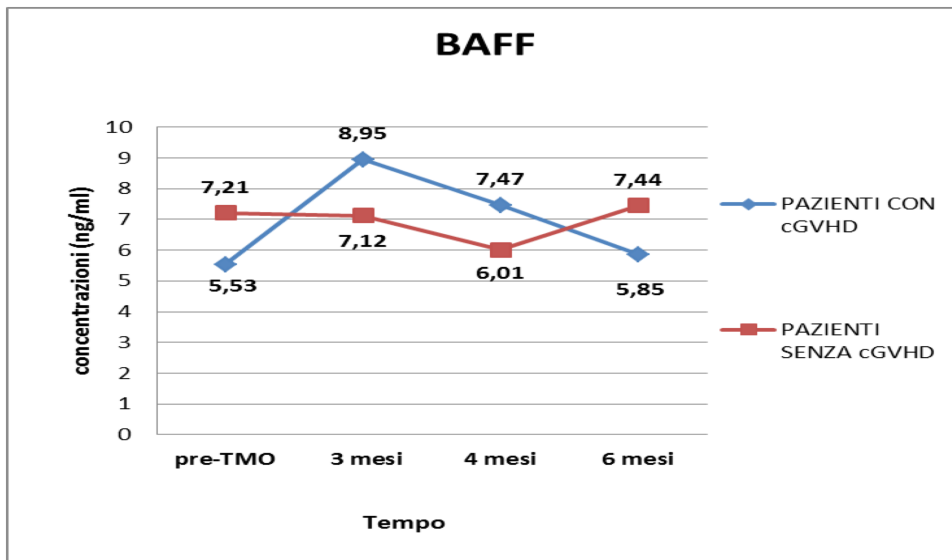


Figura 14: Confronti della produzione del BAFF tra il gruppo di pazienti che sviluppano la cGVHD e il gruppo senza cGVHD

IV.5. Sopravvivenza

Quaranta su 82 pazienti (31,7%) sono deceduti ad una mediana di 7 mesi dal trapianto.

Nei pazienti che hanno sviluppato la GVHD cronica, i decessi sono stati il 33% ad una mediana di 8 mesi dal trapianto.

CAPITOLO V – DISCUSSIONE

La fisiopatologia della GVHD cronica non è stata ancora ben definita. L'importanza immunopatogenica delle cellule T del donatore in questa malattia è già stata confermata, mentre sono emerse nuove evidenze a carico di un possibile ruolo patogenetico ad opera dei linfociti B. Ad esempio, il controllo ed il miglioramento della patologia a seguito dell'uso del Rituximab, nei pazienti con GVHD refrattaria alla terapia con steroidi, ha dimostrato anche un coinvolgimento diretto o indiretto dei linfociti B, così come il riscontro di autoanticorpi anti-PDGFR in casi di GVHD cronica simil-sclerodermica.

Alcuni autori si sono interessati alla correlazione tra i livelli di BAFF e lo sviluppo della GVHD cronica nel trapianto allogenico di cellule staminali.

V.1. GVHD cronica e ricostituzione delle cellule B dopo il trapianto allogenico

La ricostituzione dei linfociti dopo un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche non mieloablativo è stata riportata da numerosi gruppi [Sarantopoulos S, et al. Blood, 2009] [Morecki S, et al. Bone Marrow Transplant 2001] [Chao NJ, et al. Biol Blood Marrow Transplant 2002]. Questi studi sono molto eterogenei rispetto a molti fattori, quali il condizionamento, la composizione del trapianto, il tipo di donatore e l'immunosoppressione in post-trapianto.

Tutti i pazienti hanno mostrato una marcata linfopenia fino a circa 6 mesi dopo il trapianto, caratterizzata da una profonda deplezione del comparto B cellulare sia nel gruppo con cGVHD che in quello senza cGVHD. Dal sesto mese, tuttavia, il gruppo senza GVHD cronica ha mostrato un recupero più rapido della quota linfocitaria generale e dei livelli di linfociti B circolanti in particolare.

Di fatto, sia la GVHD acuta che la cronica [Maury S et al. Br J Haematol 2001], insieme al loro trattamento, si sono dimostrate importanti inibitori della linfopoiesi B [Storek J, et al. Blood 2001]. Inoltre esistono molteplici meccanismi alla base della ridotta linfopoiesi B presente in soggetti con GVHD cronica: il primo sarebbe la produzione di

citochine (interferone-gamma o interleuchina 1) dalle cellule attivate (rispettivamente cellule T, o macrofagi) che possono inibire la linfopoiesi B; il secondo meccanismo sarebbe la distruzione delle cellule B dello stroma midollare dai linfociti del donatore ed il terzo sarebbe la soppressione della linfopoiesi B attraverso le terapie somministrate per la GVHD stessa [Garvy BA, et al. Immunology. 1993] [Borghesi LA, et al. J Immunol. 1997].

La somministrazione del Rituximab dal condizionamento fino al 6° mese post trapianto è avvenuta nel 59% dei pazienti studiati, ma di fatto non ha determinato una deplezione significativamente maggiore rispetto ai pazienti che non lo hanno ricevuto, relativamente al periodo di osservazione. Anche Sarantopoulos ha confermato la presenza di una linfopenia B cellulare nei pazienti che sviluppano una GVHD cronica dovuta ad una ricostituzione linfocitaria B ritardata nei pazienti trapiantati [Sarantopoulos S et al, Blood, 2009]. Petersen, in una casistica di 76 trapianti, , osserva una maggiore incidenza di cGVHD nei pazienti sottoposti a regime non mieloablato rispetto a quello mieloablato, in concomitanza ad una ritardata ricostituzione B cellulare nei trapianti non mieloablato. In particolare osserva una conta B linfocitaria decisamente ridotta soprattutto a 120 giorni post-trapianto, senza riuscire a identificare una differenza significativa rispetto al gruppo trattato con un regime di condizionamento mieloablato [Petersen SL et al. Bone Marrow Transplantation, 2003].

Altri studi hanno identificato invece una rapida ricostituzione iniziale della popolazione dei linfociti B [Patriarca F et al. Exp Hematol. 2006] nel caso di pazienti affetti da GVHD cronica caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi.

V.2. GVHD cronica e chimerismo B

Nella nostra casistica, abbiamo potuto analizzare estesamente il chimerismo B cellulare solo dopo il 4° mese a causa della profonda linfocitopenia dei pazienti. Tuttavia, già dal 3° mese abbiamo constatato che la linfopoiesi B post trapianto di entrambi i gruppi era caratterizzata da un chimerismo completo in tutti i casi che avevano sviluppato un attecchimento completo della frazione granulocitaria e linfoide T. Non ci sono molti dati in letteratura in merito alla composizione chimerica della frazione B linfocitaria, ma già dei modelli murini avevano fatto ipotizzare che le cellule B del ricevente non fossero necessarie per indurre o per determinare la gravità della GVHD. [Matte-Martone C, et al. Biol Blood Marrow Transplant 2010]. Inoltre, questa nostra osservazione conferma che la linfopoiesi B dopo trapianto ripopola in modo totalmente allogenico, indipendentemente dallo sviluppo o meno di cGVHD.

Nei casi di attecchimento parziale, inoltre, i soggetti che hanno successivamente sviluppato una GVHD cronica hanno presentato un livello di chimerismo misto a livello di sangue periferico con una percentuale di donatore sempre maggiore rispetto ai soggetti che non hanno manifestato una GVHD, come atteso da pubblicazioni precedenti.

V.3. GVHD cronica ed il BAFF

La citochina BAFF è stata identificata come un regolatore chiave dell'omeostasi dei linfociti normali [Brink R. et al. Semin Immunol 2006;] [Tangye SG et al. Semin Immunol. 2006].

Alcuni autori hanno suggerito che dei livelli elevati di BAFF possono essere degli importanti biomarcatori per predire lo sviluppo e la severità sia della GVHD acuta che della GVHD cronica [Sarantopoulos S, et al. Blood. 2009] [Sarantopoulos S, et al. Clin Cancer Res. 2007] [Jin Seok Kim et al. Korean J Hematol 2011] [Hakim FT, et al. Blood 2008].

Nel gruppo oggetto di studio, l'andamento dei livelli sierici di BAFF non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti e pertanto non si è dimostrato un buon indicatore prognostico dello sviluppo di una GVHD cronica. Per contro, come nel lavoro di Sarantopoulos, pare che i soggetti senza GVHD recuperino

più precocemente la linfopoiesi B, mentre i soggetti affetti da cGVHD sembrano manifestare una linfopenia più prolungata.

Il rapporto tra BAFF sierico e livelli circolanti di cellule CD19 non ha evidenziato differenze statisticamente significative nei 2 gruppi, ma ha mostrato che i soggetti con GVHD cronica sembrano avere tendenzialmente dei rapporti più alti di quelli del gruppo senza GVHD, verosimilmente per una più lenta ricostituzione B cellulare che si instaura in questi pazienti, analogamente a quanto ritrovato in corso di GVHD cronica da Sarantopoulos [Sarantopoulos S, et al. Blood. 2009].

Inoltre, è interessante notare che Sarantopoulos identifica le alterazioni dei livelli sierici di BAFF e il conseguente rapporto BAFF/CD19 in una casistica di soggetti affetti da GVHD cronica attiva aventi una sopravvivenza di almeno 12 mesi. Anche Jacobson [Jacobson CA et al. 3036: ASH2011; S.Diego USA, 10-12 dec] in uno studio prospettico su 440 pazienti, trova modificazioni significative dei livelli di BAFF e del rapporto con le cellule CD19 solo dopo il 6° mese dal trapianto. Probabilmente le nostre osservazioni, condotte fino al 6° mese, andranno confermate su una casistica più ampia e con un tempo di follow-up maggiore, pari ad almeno a 12 mesi.

Per contro, il lavoro di Cho mette in luce che un incremento dei livelli di BAFF solubile (sBAFF) nel siero nel periodo pre-trapiantologico si associa con una diminuita incidenza di aGVHD e può riflettere una relativa linfopenia B durante il periodo peritrapiantologico [Cho BS, et al. Biol Blood Marrow Transplant 2010]. Secondo questa osservazione, inoltre, il sBAFF rilevato prima del condizionamento sarebbe prodotto dalle cellule del soggetto ricevente, e ciò rifletterebbe lo stato immunologico del paziente, soprattutto nei confronti dell'omeostasi delle cellule B che potrebbe esser stata intaccata dalle precedenti chemioterapie e dallo stato di malattia residua. Secondo questo autore, pertanto, un elevato livello di sBAFF al giorno 0, essendo correlato ad una bassa incidenza di aGVHD (fattore di rischio della cGVHD), sarebbe una preconditione per un'adeguata ricostituzione delle cellule B, elemento molto importante per la prevenzione della cGVHD.

Anche per Sarantopoulos la precoce ricostituzione B linfocitaria rappresenta un passaggio chiave nella prevenzione della GVHD cronica, ma nel suo lavoro sottolinea che elevati livelli di BAFF in presenza di minime conte di cellule B naïve possono sostenere la sopravvivenza di cellule B autoreattive ed alloreattive attivate, risultando in una patologia immune [Sarantopoulos S, et al. Blood. 2009].

Sempre secondo Sarantopoulos, il BAFF-R viene espresso in più del 90% delle cellule B CD19+ di donatori normali, di pazienti senza cGVHD e nei pazienti con cGVHD inattiva. I livelli plasmatici di BAFF più alti sono stati scoperti nei pazienti con attiva cGVHD e sono risultati significativamente più elevati rispetto ai pazienti con malattia inattiva o ai pazienti che non hanno mai sviluppato la cGVHD dopo il trapianto. Nei pazienti senza cGVHD, elevati livelli plasmatici di BAFF sono stati correlati con basse conte di linfociti B, mentre nei soggetti con attiva cGVHD alti livelli plasmatici di BAFF non correlavano con le conte di cellule B nel sangue periferico [Sarantopoulos S, et al. Clin Cancer Res. 2007].

CAPITOLO VI – CONCLUSIONI

Nella nostra casistica, il compartimento dei linfociti B presenta un attecchimento stabile di origine del donatore a +120 giorni in tutti i pazienti in cui è avvenuto l'attecchimento, indipendentemente dal tipo di donatore, dal tipo di condizionamento o dalla patologia trattata. Questo dato rafforza precedenti evidenze sperimentali che siano le cellule B del donatore ad avere un possibile ruolo patogenetico nella GVHD cronica, rispetto a quelle del paziente.

Dopo il trapianto allogenico di cellule staminali, indipendentemente dalle terapie somministrate e dall'uso di Rituximab, si assiste ad una severa linfocitopenia che persiste fino a +120 giorni dal trapianto dei progenitori emopoietici in tutti i pazienti, senza nessuna differenza tra i pazienti cGVHD positivi e negativi.

Il recupero B cellulare presenta una tendenza a risalire più rapidamente già a partire dal 6° mese, nel gruppo di soggetti non affetti da GVHD cronica, seppure non siano state evidenziate differenze significative tra i 2 gruppi.

I livelli sierici di BAFF sembrano non correlare con lo sviluppo di GVHD cronica, mentre il rapporto BAFF/CD19+ pare diminuire tendenzialmente di più nei soggetti che non sviluppano GVHD rispetto all'altro gruppo, a causa del più rapido recupero dei linfociti B.

I dati ottenuti con questo studio paiono allinearsi alle evidenze riportate da altri autori [Sarantopoulos S, 2009], ma andranno confermati con l'ampliamento della casistica in modo da poter identificare sottogruppi omogenei per patologia e condizionamento più ampi e con il prolungamento del follow-up.

BIBLIOGRAFIA

Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of Complete and Mixed Donor Chimerism After Allogeneic Lymphohematopoietic Transplantation: Recommendations From a Workshop at the 2001 Tandem Meetings, Biology of Blood and Marrow Transplantation 2001;7:473-485

Apperley J, Carreras E, Gluckman E, et al. The EBMT Hand book. 5th edition. 2008

Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest 2003;112:286-97

Baron F, Sandmaier BM, Gooley T, et al. Higher doses of transplanted T and B cells are associated with greater incidence of extensive chronic GVHD after PBSC transplantation from HLA identical sibling donors [abstract]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2007;110(11): Abstract 1077

Berger R, Le Coniat M, Derre J, et al. Secondary non random chromosomal abnormalities of band 13q34 in Burkitt lymphoma-leukemia. Genes Chromosomes Cancer 1989;1:115-18

Borghesi LA, Smithson G, Kincade PW. Stromal cell modulation of negative regulatory signals that influence apoptosis and proliferation of B lineage lymphocytes. J Immunol. 1997;159:4171-4179

Boule MW, Broughton C, Mackay F, et al. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. J Exp Med 2004;199:1631-40

Brink R, Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. Semin Immunol 2006;18:276-83
Cancro MP, Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. Immunol Rev 2004;197:89-101

Jacobson CA, Kim Haesook T, Sarantopoulos S, et al. Patterns of B Cell Activating Factor (BAFF) Levels, B Cell Recovery, and BAFF/B Cell Ratios Correlate with the Development of Chronic Graft-Versus-Host Disease (cGVHD) Following Hematopoietic

Stem Cell Transplantation (HSCT). 53rd ASH Annual Meeting and Eposition, December 10-13 2011, abs. 3036

Moisini I, et A. Davidson A, BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases. 2009 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 158:155–163

Socié G, Chronic GVHD: B cells come of age. Blood 2011;117:2086-2087

Castoldi G, Liso V, Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V^a edizione 2007; 21:641-54

Chan EY, Lawton JW, Lie AK, et al. Autoantibody formation after allogeneic bone marrow transplantation: correlation with the reconstitution of CD5⁺ B cells and occurrence of graft-versus-host-disease. Pathology. 1997 ;29(2)184-188

Chao NJ, Liu CX, Rooney B et al. Non myeloablative regimen preserves “niches” allowing for peripheral expansion of donor T cells. Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8:249–256

Cho BS, Min CK, Kim HJ, et al. High levels of B cells activating factor during the peritransplantation period are associated with a reduced incidence of acute graft-versus-host-disease following myeloablative allogeneic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2010;16:629-638

Garsili CG, Pennline KJ, Smith SR, et al. Cytokine gene expression in mice undergoing chronic graft versus host disease. Mol Immunol 1993;30:669-77

Garvy BA, Telford WG, King LE, et al. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. Immunology. 1993;79:270-277

Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature 2000;404:995–9

Hahne M, Kataoka T, Schroter M, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. J Exp Med 1998;188:1185–90

Hakim FT, Rehman N, Dickinson J, et al. Elevated BAFF is correlated with inflammatory processes in chronic graft versus host disease and supports increases in transitional B cells [abstract]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008;112(11): Abstract 465

Jiang Y, Ohtsuji M, Abe M, et al. Polymorphism and chromosomal mapping of the mouse gene for B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (Baff) and association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics* 2001;53:810–13

Jin Seok Kim, Soo-Jeong Kim, June-Won Cheong, et al. Clinical significance of B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Korean J Hematol* 2011;46:175-9

Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, et al. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol* 2007;37:1785–95

Kayagaki N, Yan M et al. BAFF/BlyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity*. 2002;17(4):515-524

LeBien TW. Fates of human B-cells precursors. *Blood* 2000;96:9-23

Lee S, Klein J, Barret J, et al, severity of chronic graft versus host disease : association with treatment related mortality and relapse, *blood* 2002;100 :406-14

Lesley R, Xu Y, Kalled SL, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 2004;20:441-53

Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:168-71

Marsters SA, Yan M, Pitti RM, et al. Interaction of the TNF homologues BlyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol* 2000;10:785–8

Matte-Martone C, Wang X, Anderson B, et al. Recipient B Cells Are Not Required for Graft-Versus-Host Disease Induction, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1222-1230

Maury S, Mary JY, Rabian C et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol* 2001;115:630–641

Melchers F, Actions of BAFF in B cell maturation and its effects on the development of autoimmune disease. *Ann Rheum Dis*.2003;62:25–27

Mohr E, Serre K, Manz RA et al. Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J Immunol* 2009;182:2113–23

Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 2004;103:3148-57

Morecki S, Gelfand Y, Nagler A et al. Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:243–249

Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu GL, et al. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappa B, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999;274:15978–81

Mutis T, Gillespie G, Schrama E, et al. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999;5:839-42

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 2001;97:198–204)

Nash RA, Antin JH, Karanes C et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 2000;96:2062–2068

Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, et al. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002;100:2973-9

Novak AJ, Grote DM, Stenson M et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cells non-Hodgkin lymphoma : correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* 2004;104:2247-53

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 2004;199:91-7

Panse JP, Heimfeld S, Guthrie KA, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning. *Br J Haematol.* 2005;128(5):659-667

Patriarca F, Skert C, Sperotto A, et al. the development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-versus-host-disease and immune recovery. *Exp Hematol.* 2006;34(3):389-396

Pavletic S, Carter S, Kernan N, et al. influence of T cell depletion on chronic graft versus host disease: results of a multicentre randomised trial in unrelated donor transplantation. *Blood.* 2005;106(9):3308-13

Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca I, Díez-Campelo M, et al. Chronic Graft- Versus- Host Disease. *Drugs* 2006;66(8):1041-1057

Petersen SL, Ryder LP, Bjo P, et al. Immune Reconstitution, A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or non myeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors, *Bone Marrow Transplantation* 2003;32:65-72

Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998;92:2303–2314

Rennert P, Schneider P, Cachero TG, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 2000;192:1677–84

Ruggeri L. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097-2100

Saitoh T, Fujiwara M, Asakura H. L3T4+ T cells induce hepatic lesions resembling primary biliary cirrhosis in mice with graft-versus-host-reaction due to major histocompatibility complex class II disparity. *Clin immunol immunopathol* 1991;59:449-61

Sánchez-García J, Serrano J, Gómez P, et al. The impact of acute and chronic graft-versus-host disease on normal and malignant B-lymphoid precursors after allogeneic

stem cell transplantation for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica/the hematology journal* 2006;91:340-347

Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. High levels of B cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host-disease. *Clin Cancer Res.* 2007;13(20):6107-6114

Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft versus host disease. *Blood.* 2009;113(16):3865-3874

Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999;189:1747-56

Schneider P, The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:282-9

Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, et al. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;114(24):4919-4927

Shlomchik WC, Couzens MS, Tang CB et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen presenting cells. *Science* 1999;285:412-5

Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol* 1999;65:680-3

Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 2004;173:2331-41

Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG et al. Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappa B substrate for prosurvival BlyS signaling. *Nat Immunol* 2008;9:1379-87

Storek J, Wells D, Dawson MA et al. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2001;98:489-491

Stuart G. Tangye, Bryant VL, Cuss AK, et al. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Seminars in Immunology* 2006;18:305-317

Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host-disease. *Blood.* 2007;110(1):237-241

Teshima T, Ordemann R, Reddy P et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* 2002;8:575-581

Thiede C, Bornhauser M et Ehninger G, "Strategies and Clinical Implications of Chimerism Diagnostics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation" *Acta Haematologica*, 2004;112:16–23

Thiede C, Bornhauser M, Oelschläger U, et al. "Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers" *Leukemia*, 2001;15:293-302

Thiede C, Florek M, Bornhauser M, et al. "Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection" *Bone Marrow Transplantation*, 1999;23:1055–1060

Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med* 2000;192:129–35

Tremblé LS, Carlesso G, Hoek KL et al. TLR stimulation modifies BlyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *J Immunol* 2007;178:7531–9

Ueda Y, Yang K, Foster SJ, et al. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* 2004;199:47-58

Ware CF. APRIL and BAFF connect autoimmunity and cancer. *J Exp Med* 2000;192:F35–8

Wingard JR, Piantadosi S, Vogelsang GB et al. Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Blood* 1989;74:1428–1435

Ye Q, Wang L, Wells AD, et al. BAFF binding to T cell expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *Eur J Immunol* 2004;34:2750-9

Zaja F, Bacigalupo A, Patriarca F, et al. Treatment of refractory chronic GVHD with rituximab: a GITMO study *Bone Marrow Transplantation* 2007;40:273–277

Zhang C, Todorov I, Zhang Z, et al. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host-disease with autoimmune manifestations. *Blood* 2006;107:2993-3001