

## Analisi genetica di pazienti ematologici italiani candidati al trapianto di midollo osseo da donatore non consanguineo

Sabina RENDINE (a), Mario BARBANTI (b), Nicoletta SACCHI (b)  
e Emilio Sergio CURTONI (a)

(a) Servizio di Immunologia dei Trapianti, Ospedale Molinette, Torino;  
Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università degli Studi, Torino

(b) Laboratorio di Tipizzazione Tissutale e Istocompatibilità,  
E.O. Ospedali Galliera, Genova

**Riassunto.** - In questo studio sono state calcolate le frequenze geniche ed aplotipiche dei loci HLA-A, -B e -DR di 1945 pazienti ematologici italiani candidati al trapianto di midollo osseo da donatore non consanguineo. Tali frequenze sono state confrontate con quelle ottenute dalla popolazione dei potenziali donatori di midollo osseo iscritti nel registro italiano. Nessuna differenza risulta essere statisticamente significativa se si effettua la correzione per il numero di confronti eseguiti, indicando quindi che i pazienti non presentano nel loro complesso caratteristiche genetiche diverse da quelle dei donatori.

*Parole chiave:* pazienti ematologici, frequenze geniche, frequenze aplotipiche, HLA.

**Summary** (*Genetic analysis of Italian hematologic patients requiring bone marrow transplantation from unrelated donors*). - Frequencies of HLA-A, -B and -DR antigens and haplotypes were determined in 1945 Italian patients suffering from hematologic diseases and requiring bone marrow transplantation from unrelated donors. These frequencies were compared with those obtained from the Italian bone marrow donor population. No significant differences were found when considering the number of comparisons made, suggesting that the genetic structure of the Italian patients is not different from that of the Italian donor population.

*Key words:* hematologic patients, gene frequencies, haplotype frequencies, HLA.

### Introduzione

Il trapianto di midollo osseo rappresenta una procedura terapeutica diffusamente utilizzata per la cura di una varietà di patologie ematologiche sia neoplastiche sia di tipo diverso. La maggior parte dei pazienti però non dispone di un familiare compatibile per gli antigeni HLA, quindi l'unica possibilità è di trovare un donatore istocompatibile non consanguineo. Negli ultimi anni la costituzione di registri nazionali di donatori volontari di midollo osseo, e la confluenza di questi in una rete internazionale che al momento attuale raccoglie complessivamente circa 5 milioni di donatori, ha consentito ad una percentuale sempre più alta di pazienti di avvantaggiarsi di un trapianto di midollo da donatore non consanguineo. Tuttavia l'alto grado di polimorfismo del sistema HLA fa sì che molti pazienti non riescano comunque a trovare un donatore idoneo. Il presente studio ha lo scopo di descrivere un campione significativo della popolazione di pazienti italiani candidati al trapianto di midollo osseo e di analizzarne le caratteristiche genetiche per quanto riguarda il sistema principale di istocompatibilità, HLA. Inoltre è di interesse il confronto

tra tale popolazione e quella dei potenziali donatori italiani al fine di determinare se le due popolazioni possano ritenersi geneticamente omogenee, oppure se vi sia una qualche differenza tra i pazienti e i donatori, per esempio a causa di una associazione tra malattie ematologiche e determinati alleli del sistema HLA.

### Materiali e metodi

Sono stati esaminati i pazienti per i quali è stata attivata una ricerca di un donatore non consanguineo presso il registro italiano (*Italian Bone Marrow Donor Registry*, IBMDR).

Complessivamente 1945 pazienti si sono rivolti all'IBMDR dal 1989, anno di costituzione del registro, all'ottobre del 1998. Tutti risultano essere stati tipizzati sierologicamente per HLA-A, -B e -DR.

1381 tipizzazioni DR sono state confermate utilizzando tecniche di biologia molecolare.

La determinazione sierologica delle specificità antigeniche dei loci HLA è stata fatta, come di consueto, mediante l'uso di antisieri che possono riconoscere

un gruppo di antigeni oppure un singolo antigene. Esistono infatti antisieri in grado di distinguere gli antigeni appartenenti ad alcuni di questi gruppi; pertanto l'attribuzione antigenica può essere effettuata a livelli diversi, definiti come segue: 1) "supertipico" se si identifica il gruppo (es. A9, che comprende A23 e A24, definito "supertipo" degli stessi); 2) "sottotipico" se viene determinato invece il singolo antigene (es. A23 oppure A24, definiti "sottotipi" di A9) (Tab. 1).

Le patologie più frequenti per i cui portatori è stata effettuata una ricerca di donatore compatibile nel registro IBMDR risultano essere: leucemie mieloidi croniche (34,4%), leucemie acute (32,5%) e leucemie mieloidi acute (8%).

Le frequenze geniche ed aplo tipiche sono state stimate mediante il metodo della massima verosimiglianza, utilizzando l'algoritmo *expectation-maximization* [1, 2].

Il confronto delle frequenze geniche della popolazione dei pazienti con quelle della popolazione dei potenziali donatori è stato effettuato determinando l'intervallo

di confidenza al 95% (ovvero considerando un livello di significatività del 5%) di ciascuna frequenza genica e considerando significativamente diverse le frequenze delle due popolazioni nei casi in cui le coppie di intervalli, della popolazione dei pazienti e di quella dei donatori, non si sovrappongono. Infatti in questo caso si può rifiutare l'ipotesi che i pazienti e i donatori provengano dalla medesima popolazione, con un margine di errore del 5%.

Le caratteristiche della popolazione dei donatori sono state studiate nell'indagine di Rendine *et al.* [3]; a questa si rimanda per la descrizione di tale popolazione e per i criteri di selezione degli antigeni che, per uniformità, sono stati adottati anche nell'elaborazione dei dati dei pazienti.

E' stata anche analizzata la distribuzione dei pazienti in funzione del numero di donatori ad essi compatibili per HLA-A e -B e per HLA-A, -B e -DR. Inoltre poiché le tipizzazioni dei pazienti e dei donatori sono state in parte determinate a livello supertipico e in parte a livello

**Tabella 1.** - Elenco degli antigeni per *locus* considerati nell'analisi

HLA-A		HLA-B		HLA-DR
A1		B51*	(B5)	DR1
A2		B52*	(B5)	DR2 (DR2+DR15+DR16)
A3		B7		DR3 (DR3+DR17+DR18)
A23*	(A9)	B8		DR4
A24*	(A9)	B44*	(B12)	DR5 (DR5+DR11+DR12)
A25*	(A10)	B45*	(B12)	DR6 (DR6+DR13+DR14)
A26*	(A10)	B13		DR7
A34*	(A10)	B14	(B14+B64+B65)	DR8
A66*	(A10)	B62*	(B15)	DR9
A11		B63*	(B15)	DR10
A29*	(A19)	B75*	(B15)	
A30*	(A19)	B76*	(B15)	
A31*	(A19)	B77*	(B15)	
A32*	(A19)	B38*	(B16)	
A33*	(A19)	B39*	(B16)	
A74*	(A19)	B17	(B17+B57+B58)	
A28	(A28+A68+A69)	B18		
A36		B49*	(B21)	
A43		B50*	(B21)	
		B22	(B22+B54+B55+B56)	
		B27		
		B35		
		B37		
		B40	(B40+B60+B61)	
		B41		
		B42		
		B46		
		B47		
		B48		
		B53		
		B59		
		B67		
		B70	(B70+B71+B72)	
		B73		

(\*) Antigeni sottotipici dell'antigene supertipico riportato tra parentesi.

**Tabella 2.** - Distribuzione delle frequenze (%) degli antigeni HLA-A, -B e -DR, con relativi errori standard (ES) e intervalli di confidenza (IC), nella popolazione dei pazienti ematologici ed in quella dei potenziali donatori di midollo osseo

Antigene	Pazienti				Donatori			
	Frequenza (%)	ES	IC		Frequenza (%)	ES	IC	
			Inferiore	Superiore			Inferiore	Superiore
A1	10,85	0,499	9,88	11,83	12,08	0,052	11,98	12,18*
A11	6,21	0,387	5,45	6,97	6,01	0,038	5,94	6,09
A2	26,19	0,705	24,81	27,57	25,38	0,069	25,24	25,51
A23	2,21	0,236	1,75	2,67	2,54	0,025	2,49	2,59
A24	13,25	0,544	12,19	14,32	12,24	0,052	12,14	12,34
A25	1,92	0,220	1,49	2,35	1,86	0,021	1,82	1,90
A26	5,00	0,349	4,32	5,68	5,02	0,035	4,95	5,08
A28	3,65	0,301	3,06	4,24	3,90	0,031	3,84	3,96
A29	3,32	0,287	2,76	3,89	3,48	0,029	3,42	3,53
A3	11,72	0,516	10,71	12,73	11,39	0,050	11,29	11,49
A30	5,45	0,364	4,73	6,16	4,98	0,034	4,91	5,04
A31	2,28	0,239	1,81	2,75	2,51	0,025	2,46	2,56
A32	4,87	0,345	4,19	5,55	5,14	0,035	5,07	5,20
A33	2,20	0,235	1,74	2,66	2,21	0,023	2,17	2,26
A34	0,10	0,052	0,00	0,21	0,13	0,006	0,12	0,14
A36	0,03	0,026	-0,02	0,08	0,01	0,002	0,01	0,01
A66	0,21	0,073	0,06	0,35	0,13	0,006	0,12	0,14
B13	3,27	0,285	2,71	3,82	3,39	0,029	3,33	3,45
B14	3,37	0,289	2,80	3,93	3,61	0,030	3,55	3,67
B17	5,04	0,351	4,35	5,73	4,86	0,034	4,79	4,92
B18	11,26	0,507	10,27	12,25	9,66	0,047	9,57	9,75*
B22	2,78	0,263	2,26	3,29	2,59	0,025	2,54	2,64
B27	1,88	0,218	1,45	2,30	1,93	0,022	1,89	1,97
B35	15,42	0,579	14,29	16,56	15,93	0,058	15,81	16,04
B37	1,23	0,177	0,89	1,58	1,40	0,019	1,36	1,43
B38	3,29	0,286	2,72	3,85	3,56	0,029	3,51	3,62
B39	2,78	0,264	2,27	3,30	2,75	0,026	2,70	2,80
B40	2,75	0,262	2,24	3,27	2,66	0,025	2,61	2,71
B41	1,54	0,198	1,15	1,93	1,42	0,019	1,38	1,45
B42	0,05	0,036	-0,02	0,12	0,06	0,004	0,05	0,06
B44	9,47	0,469	8,55	10,39	9,20	0,046	9,11	9,29
B45	0,58	0,122	0,34	0,82	0,46	0,011	0,44	0,49
B46	0,03	0,026	-0,02	0,08	0,01	0,002	0,01	0,01
B47	0,33	0,093	0,15	0,52	0,37	0,010	0,35	0,39
B48	0,10	0,051	0,00	0,20	0,02	0,002	0,01	0,02
B49	3,33	0,288	2,77	3,89	3,53	0,029	3,47	3,59
B50	1,91	0,220	1,48	2,34	1,87	0,021	1,82	1,91
B51	10,37	0,489	9,41	11,32	10,47	0,048	10,38	10,57
B52	1,82	0,214	1,40	2,24	1,44	0,019	1,40	1,48
B53	0,87	0,149	0,58	1,17	0,89	0,015	0,86	0,92
B62	2,69	0,259	2,18	3,20	3,31	0,028	3,25	3,36*
B63	1,35	0,185	0,98	1,71	1,45	0,019	1,42	1,49
B7	6,45	0,394	5,68	7,22	5,68	0,037	5,61	5,75
B70	0,72	0,136	0,45	0,99	0,37	0,010	0,35	0,38*
B73	0,08	0,044	-0,01	0,16	0,16	0,006	0,15	0,17
B75	0,00	0,000	0,00	0,00	0,01	0,002	0,01	0,02
B76	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,001	0,00	0,00
B77	0,00	0,000	0,00	0,00	0,01	0,001	0,00	0,01
B8	5,22	0,357	4,52	5,92	5,93	0,037	5,85	6,00
DR1	8,59	0,449	7,71	9,47	8,85	0,086	8,69	9,02
DR2	12,96	0,539	11,91	14,02	12,67	0,101	12,47	12,87
DR3	9,34	0,466	8,42	10,25	9,96	0,091	9,78	10,14
DR4	7,67	0,427	6,83	8,50	7,67	0,081	7,51	7,83
DR5	26,55	0,708	25,16	27,94	24,51	0,131	24,25	24,77*
DR6	16,36	0,593	15,19	17,52	16,11	0,112	16,89	16,33
DR7	13,09	0,541	12,03	14,15	12,64	0,101	12,44	12,84
DR8	2,98	0,272	2,44	3,51	3,38	0,055	3,28	3,49
DR9	0,37	0,098	0,18	0,56	0,58	0,023	0,54	0,63
DR10	1,69	0,206	1,28	2,09	1,79	0,040	1,71	1,87
DR103	0,21	0,073	0,06	0,35	0,22	0,014	0,19	0,25

(\*) Differenze significative non tenendo conto del numero dei confronti effettuati. ES: errore standard; IC: intervallo di confidenza.

**Tabella 3.** - Frequenze (%) degli aplotipi più comuni per i loci HLA-A e -B che raggiungono una frequenza cumulativa del 50% nella popolazione dei pazienti ed in quella dei donatori

Aplotipo		Pazienti	Donatori
A2	B51	4,18	4,18
A2	B18	3,63	3,04
A1	B8	3,11	3,63
A2	B44	3,00	2,74
A3	B35	2,97	2,97
A24	B35	2,82	2,97
A2	B35	2,66	2,74
A3	B7	2,58	2,30
A11	B35	2,37	2,28
A24	B18	1,74	1,68
A2	B17	1,70	1,58
A30	B18	1,54	1,33
A1	B17	1,47	1,45
A2	B7	1,37	1,12
A29	B44	1,36	1,70
A33	B14	1,32	1,45
A30	B13	1,31	1,51
A2	B39	1,24	1,02
A24	B44	1,22	0,91
A26	B38	1,12	1,28
A3	B51	1,11	1,00
A2	B62	0,98	1,13
A11	B18	0,97	
A23	B44	0,88	0,75
A24	B51	0,86	1,09
A32	B35	0,84	1,04
A2	B50	0,83	0,89
A2	B49	0,81	0,85
A1	B18	0,78	
A1	B35		1,23
A2	B40		0,87
<b>Frequenza cumulativa</b>		<b>50,74</b>	<b>50,71</b>

lo sottotipo (per cui risultano presenti ad es. sia A9, sia A23 e A24), la compatibilità è stata valutata in due modi: a) considerando in entrambe le popolazioni gli antigeni selezionati (elencati nella Tab. 1) ed eliminando gli individui con almeno un antigene tra quelli supertipici non considerati; b) considerando solamente gli antigeni supertipici (ad es. A23 e A24 considerati come A9).

### Risultati

La distribuzione delle frequenze degli antigeni dei loci HLA-A, -B e -DR nei pazienti e nei donatori è riportata in Tab. 2, insieme ai relativi errori standard (ES) e intervalli di confidenza (IC). Se i risultati dei test statistici non vengono corretti per il numero di confronti fatti, nella popolazione dei pazienti due antigeni risultano avere una frequenza significativamente più bassa rispetto a quella dei donatori: A1 (10,85% vs 12,08%) e

B62 (2,69% vs 3,31%); mentre tre antigeni hanno frequenze significativamente più elevate: B18 (11,26% vs 9,66%), B70 (0,72% vs 0,37%) e DR5 (26,55% vs 24,51%). Queste differenze potrebbero essere dovute ad una tipizzazione più accurata dei pazienti rispetto a quella dei donatori oppure alla elevata dimensione del campione dei donatori, cento volte superiore a quella del campione dei pazienti, che rende bassi gli errori standard delle frequenze geniche di tale popolazione, rendendo significative differenze non molto marcate. Peraltro

**Tabella 4.** - Frequenze (%) degli aplotipi più comuni per i loci HLA-A, -B e DR che raggiungono una frequenza cumulativa del 30% nella popolazione dei pazienti ed in quella dei donatori

Aplotipo			Pazienti	Donatori
A1	B8	DR3	2,38	2,74
A2	B18	DR5	2,24	1,77
A2	B51	DR5	1,62	1,53
A24	B35	DR5	1,53	1,44
A30	B18	DR3	1,30	1,07
A3	B7	DR2	1,26	1,12
A2	B35	DR6	1,18	0,92
A24	B18	DR5	1,17	1,06
A2	B44	DR5	1,09	0,74
A29	B44	DR7	0,99	1,27
A30	B13	DR7	0,94	1,04
A33	B14	DR1	0,87	0,93
A11	B35	DR5	0,86	0,49
A2	B44	DR7	0,85	
A2	B51	DR2	0,83	0,55
A3	B35	DR5	0,77	0,83
A24	B35	DR6	0,70	0,44
A3	B35	DR4	0,69	
A3	B51	DR5	0,69	0,41
A2	B17	DR7	0,68	0,48
A2	B7	DR2	0,65	0,46
A2	B51	DR6	0,65	0,76
A3	B35	DR6	0,62	0,44
A2	B17	DR2	0,61	0,51
A1	B35	DR5	0,60	0,49
A1	B17	DR7	0,60	0,71
A23	B44	DR7	0,58	0,50
A11	B35	DR1	0,58	0,60
A3	B35	DR1	0,58	0,92
A2	B50	DR7	0,54	0,54
A2	B39	DR2	0,54	
A24	B44	DR5	0,54	
A2	B35	DR5	0,53	0,73
A26	B38	DR6		0,57
A11	B35	DR6		0,55
A2	B44	DR4		0,53
A2	B8	DR3		0,50
A2	B13	DR7		0,47
A24	B51	DR5		0,46
A2	B44	DR2		0,44
A2	B18	DR3		0,42
A32	B35	DR5		0,40
A2	B51	DR8		0,39
<b>Frequenza cumulativa</b>			<b>30,24</b>	<b>30,23</b>

occorre tenere presente che sono stati effettuati 61 confronti e, se il livello di significatività viene corretto per tale numero, nessuna differenza risulta significativa. Per quanto riguarda gli antigeni DR è opportuno sottolineare che i donatori italiani vengono generalmente tipizzati per gli antigeni di classe II quando risultano compatibili per HLA-A e -B con un paziente, pertanto rappresentano un campione selezionato: le frequenze geniche potrebbero quindi non essere rappresentative della popolazione italiana, come già commentato in Rendine *et al.* [3].

Nella Tab. 3 sono riportati i più frequenti aplotipi HLA-A e -B che rappresentano una frequenza cumulativa pari al 50% nella popolazione dei pazienti e in quella dei donatori. La Tab. 4 elenca gli aplotipi più comuni per i loci HLA-A, -B e -DR che raggiungono una frequenza complessiva del 30%, poiché in questo caso il numero di aplotipi diversi è più elevato. I pazienti mostrano una distribuzione degli aplotipi più comuni analoga a quella dei donatori; questi ultimi presentano, soprattutto sui tre loci, una maggiore variabilità aplotipica dovuta alle notevoli dimensioni del campione, come messo in evidenza dal numero maggiore di aplotipi necessari a raggiungere una frequenza complessiva del 30%.

La distribuzione dei pazienti in funzione del numero di donatori ad essi compatibili è riportata nella Tab. 5. Merita una particolare considerazione la percentuale di pazienti che non trovano corrispondenza con i donatori: questa rappresenta la percentuale di fenotipi nuovi rispetto a quelli dei donatori. A livello supertipico, considerando i loci HLA-A e -B, questo valore (0,85%) è analogo a quello osservato nella popolazione dei donatori, in cui su 231 889 individui, 1780 (0,77%) fenotipi sono unici. Considerando invece tutti e tre i loci si osserva un valore pari a 35,01%, più alto rispetto a quello dei donatori che è uguale a 28,7% (19 207 fenotipi unici su 66 817 individui). Ciò è dovuto molto probabilmente all'effetto della selezione dei donatori tipizzati per DR. Infatti tipizzando a fronte di un paziente più donatori ad esso compatibili per HLA-A e -B, la probabilità di osservare fenotipi già rappresentati è più alta di quella attesa in un campione non selezionato, di conseguenza la proporzione di fenotipi unici sul totale degli individui è più bassa. Analogamente la percentuale calcolata considerando gli antigeni selezionati risulta essere molto simile a quella osservata nella popolazione dei donatori nello studio di Rendine *et al.* [3] per i loci HLA-A e -B (3,28% vs 4%), ed è leggermente superiore per i loci HLA-A, -B e DR (45,11% vs 39%). Il campione dei pazienti presenta quindi un numero di fenotipi nuovi rispetto a quello dei donatori pari al numero atteso in un campione con caratteristiche genetiche analoghe a quelle dei donatori.

**Tabella 5.** - Percentuale di pazienti con un numero di donatori compatibili per HLA-A e -B (A) e per HLA-A, -B e -DR (B) compreso nella classe indicata, considerando in entrambe le popolazioni gli alleli selezionati elencati nella Tab. 1, oppure gli alleli supertipici

Classe	Alleli selezionati pazienti (%)	Supertipi pazienti (%)
<b>(A) HLA-A, -B</b>		
0	3,28	0,85
1-50	52,93	32,21
51-100	15,81	20,20
101-250	17,50	25,28
251-500	8,46	14,54
> 500	1,90	6,82
<b>(B) HLA-A, -B, -DR</b>		
0	45,11	35,01
1-10	44,37	50,24
11-50	9,89	13,96
51-100	0,48	0,63
> 100	0,05	0,05

## Conclusioni

Il confronto delle frequenze geniche, aplotipiche e fenotipiche dei pazienti ematologici che hanno attivato una ricerca di un donatore non consanguineo tra i donatori volontari iscritti nel registro italiano non ha fornito elementi che inducano a ritenere che i pazienti abbiano caratteristiche genetiche diverse da quelle dei donatori. Tuttavia l'eterogeneità delle patologie rappresentate nella popolazione dei pazienti non consente di trarre conclusioni circa l'associazione tra il sistema HLA e malattie ematologiche in Italia, se non a livello generale. Per tali scopi sono necessarie analisi più mirate.

Studi eseguiti sulle leucemie croniche e acute [4-8] non hanno tuttavia condotto a risultati concordanti circa i meccanismi biologici che potrebbero associare tali malattie al sistema HLA.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il Consorzio per il Sistema Informativo di Torino (CSI-Piemonte), per aver concesso l'uso gratuito delle risorse informatiche.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 27 gennaio 1999.

## BIBLIOGRAFIA

- EXCOFFIER, L. & SLATKIN, M. 1995. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol.* **12**(5): 921-927.
- LONG, J.C., WILLIAMS, R.C. & URBANEK, M. 1995. An EM algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **56**: 799-810.

3. RENDINE, S., BARBANTI, M., BORELLI, I., DALL'OMO, A.M., ROGGERO, S., SACCHI, N. & CURTONI, E.S. 1999. Il Registro Italiano dei Donatori di Midollo Osseo: struttura genetica e strategie di reclutamento. *Ann. Ist. Super. Sanità* **35**(1): 21-34.
4. D'AMARO, J., BACH, F.H., VAN ROOD, J.J., RIMM, A.A. & BORTIN, M.M. 1984. HLA-C associations with acute leukaemia. *Lancet* **24**: 1176-1178.
5. NAVARRETE, C., ALONSO, A., AWAD, J., MCCLOSKEY, D., GANESAN, T.S., AMESS, J., LISTER, T.A. & FESTENSTEIN, H. 1986. HLA class I and class II antigen associations in acute leukaemias. *J. Immunogenetics* **13**: 77-84.
6. CARUSO, C., LO CAMPO, P., BOTINDARI, C. & MODICA, A. 1987. HLA antigens in Sicilian patients affected by chronic myelogeneous leukaemia. *J. Immunogenetics* **14**: 295-299.
7. LINET, M.S., BIAS, W.B., DORGAN, J.F., MCCAFFREY, L.D. & HUMPHREY, R.L. 1988. HLA antigens in chronic lymphocytic leukemia. *Tissue Antigens* **31**: 71-78.
8. JOVENTINO, L.P., STOCK, W., LANE, N.J., DALY, K.M., MICK, R., LE BEAU, M.M. & LARSON, R.A. 1995. Certain HLA antigens are associated with specific morphologic and cytogenetic subsets of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **9**(3): 433-439.