

# Il sistema HLA

---

L'animale generalmente accetta il trapianto di un organo proprio, mentre rigetta un trapianto da altri animali, anche nell'ambito della stessa specie.

# Trapianto d'organo

---

A seconda della relazione genetica donatore/ricevente:

- autotrapianto** trasferimento di un tessuto self da una sede del corpo a un'altra dello stesso individuo. (es: ustioni)
- isotrapianto** trasferimento di un tessuto tra individui geneticamente identici (es: gemelli monozigoti)
- allograpianto** trasferimento di tessuto tra individui geneticamente diversi della stessa specie
- xenotrapianto** trasferimento di tessuto tra individui di specie diverse (es: trapianto di cuore di babuino ad uomo)

# Il sistema HLA

---

L'animale generalmente accetta il trapianto di un organo proprio, mentre rigetta un trapianto da altri animali, anche nell'ambito della stessa specie.

# Il sistema HLA

---

Il rigetto di un organo è conseguenza della interazione fra il sistema immune del ricevente il trapianto e gli antigeni di istocompatibilità presenti sulle cellule trapiantate.

# Dinamica del rigetto

---

Il rigetto del trapianto è causato principalmente da una risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di alloantigeni (in primo luogo molecole MHC) espressi dalle cellule del trapianto.

# Dinamica del rigetto

---

Il rigetto del trapianto è causato principalmente da una risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di alloantigeni (in primo luogo molecole MHC) espressi dalle cellule del trapianto.

La reazione del rigetto può essere suddivisa in:

FASE DI INDUZIONE (o sensibilizzazione) in cui i linfociti antigene-reattivi del ricevente proliferano in risposta ad alloantigeni del trapianto

FASE EFFETTRICE in cui si verifica la distruzione immunitaria del trapianto

# Antigeni dei trapianti

---

Tessuti antigenicamente simili sono detti **istocompatibili** e non inducono risposta immunitaria che porta al rigetto

Tessuti significativamente diversi dal punto di vista antigenico sono detti **istoincompatibili** e inducono risposta immunitaria che porta al rigetto

# Antigeni dei trapianti

---

Tessuti antigenicamente simili sono detti **istocompatibili** e **non inducono risposta immunitaria che porta al rigetto**

Tessuti significativamente diversi dal punto di vista antigenico sono detti **istoincompatibili** e **inducono risposta immunitaria che porta al rigetto**

I vari antigeni che determinano la istocompatibilità sono codificati da oltre 40 loci genici diversi, ma i loci responsabili delle reazioni più intense di rigetto di allotrapianto sono localizzati nel **complesso maggiore di istocompatibilità** (MHC).

L'organizzazione del sistema MCH è chiamata complesso H-2 nel topo e **complesso HLA nell'uomo**



# Il sistema HLA

---

Gli antigeni di istocompatibilità rappresentano lo stimolo primario nel rigetto

e sono codificati da un complesso di geni molto vicini fra loro definito Sistema Maggiore di Istocompatibilità (MHC).

# Il sistema HLA

---

Nell'uomo il MHC è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 e codifica il sistema HLA.

# Il sistema HLA

Il sistema maggiore di istocompatibilità, definito per l'uomo sistema HLA (*Human Leucocyte Antigens*), è costituito da un insieme di loci, posti sul braccio corto del cromosoma 6, che svolgono un ruolo determinante nel controllo delle interazioni cellulari responsabili della risposta immunologica, determinano il destino dei trapianti e appaiono essere associati ad una serie di malattie.

# Il sistema HLA

---

Il sistema HLA comprende un complesso insieme di geni e i loro prodotti proteici

# Il sistema HLA

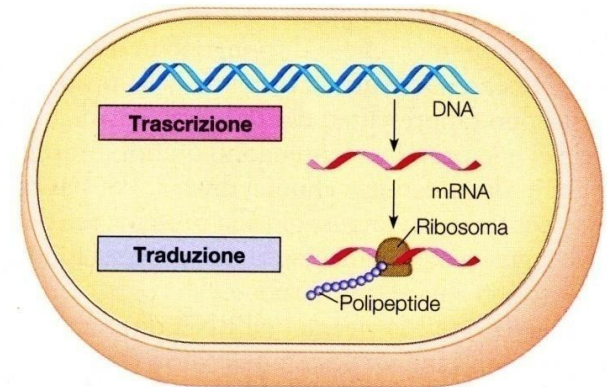
---

I geni corrispondono a porzioni di codice genetico localizzate in precise posizioni all'interno della sequenza (DNA o, più raramente, di RNA) e contengono tutte le informazioni necessarie per la produzione di una proteina.

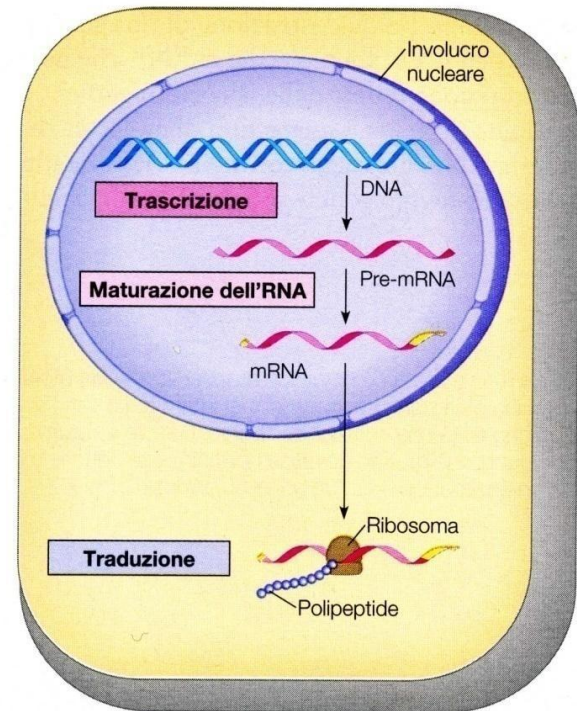
Essi sono contenuti ed organizzati all'interno dei cromosomi, presenti in tutte le cellule di un organismo.

La sintesi proteica (nota anche come traduzione genica) costituisce il processo in cui l'informazione contenuta nel DNA dei geni viene convertita in proteine che svolgono nella cellula un'ampia gamma di funzioni.

Nella sintesi proteica un filamento di RNA messaggero, prodotto a partire da un gene sul DNA attraverso il processo di trascrizione, è usato come stampo per la produzione di una specifica proteina. La relazione tra triplette di basi dell'RNA e gli amminoacidi delle proteine è definito codice genetico.



(a) **Cellula procariotica.** In una cellula sprovvista di nucleo, l'mRNA prodotto dalla trascrizione è immediatamente tradotto senza subire ulteriori modificazioni.



(b) **Cellula eucariotica.** Il nucleo fornisce un compartimento separato per la trascrizione. Il trascritto originale dell'RNA, detto pre-mRNA, subisce una serie di modificazioni prima di abbandonare il nucleo come mRNA.

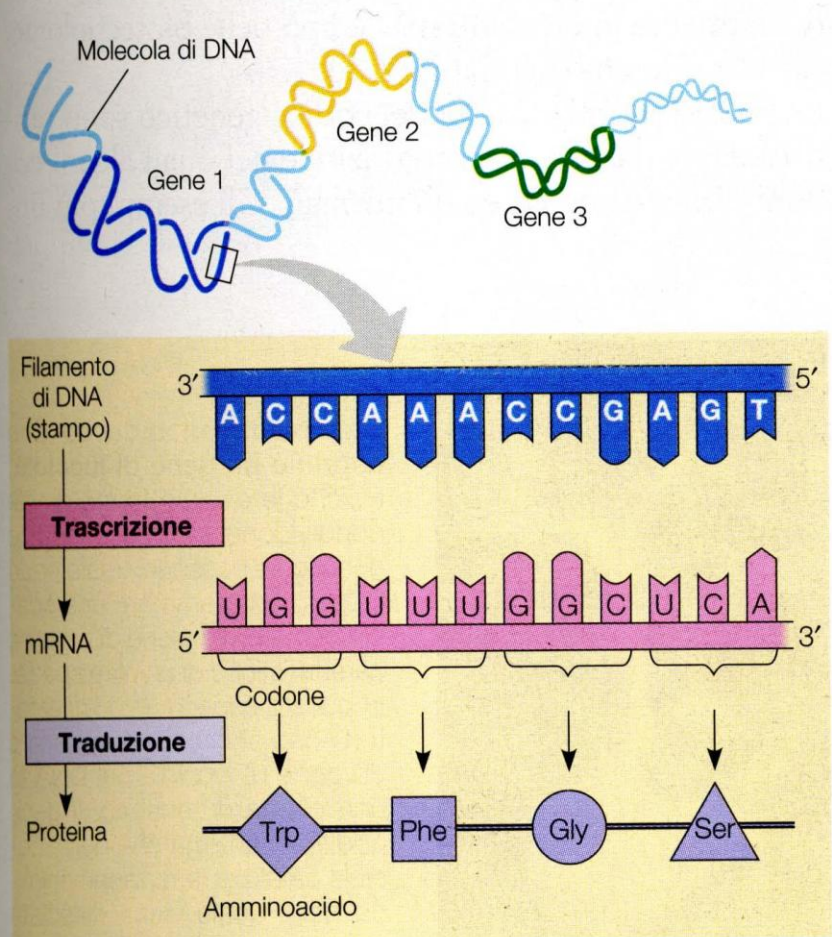
In tutti gli organismi, dai batteri alle piante agli animali, i geni presenti nel DNA nucleare sono basati su un codice di triplette di basi dei nucleotidi.

*Le triplette di nucleotidi specificano gli aminoacidi*

Le basi puriniche sono guanina e adenina nel DNA come nell'RNA;  
le basi pirimidiniche sono citosina e timina nel DNA, citosina e uracile, nell'RNA

Figura 17.3

**Il codice a triplette.** In ogni gene un filamento di DNA funge da stampo per la trascrizione – la sintesi di una molecola di mRNA complementare. Le regole di appaiamento delle basi utilizzate nella sintesi del DNA sono valide anche nella trascrizione, sebbene nell'RNA l'uracile (U) prenda il posto della timina (T). Durante la traduzione l'mRNA viene letto come una sequenza di triplette di basi, dette codoni. Ogni codone specifica l'amminoacido che deve essere aggiunto alla catena polipeptidica in via di accrescimento. L'mRNA viene letto nella direzione 5' → 3'.



## *Le triplette di nucleotidi specificano gli aminoacidi*

---

Nella sintesi proteica intervengono solo venti dei diversi aminoacidi esistenti in natura (attualmente oltre cinquecento). Dal punto di vista nutrizionale questi aminoacidi possono essere a loro volta divisi in due grandi gruppi: quello degli aminoacidi essenziali e quello degli aminoacidi non essenziali.



## *Le triplette di nucleotidi specificano gli aminoacidi*

---

Sono definiti essenziali quegli aminoacidi che l'organismo umano non riesce a sintetizzare in quantità sufficiente a far fronte ai propri bisogni.

Per l'adulto sono otto e più precisamente: fenilalanina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina, triptofano e valina.

Durante il periodo dell'accrescimento agli otto ricordati ne va aggiunto un nono, l'istidina, in considerazione del fatto che in questo periodo le richieste di tale aminoacido sono più elevate rispetto alla capacità di sintesi.

## *Le triplette di nucleotidi specificano gli aminoacidi*

---

Sono considerati *aminoacidi semiessenziali* la cisteina e la tirosina, in quanto l'organismo li può sintetizzare a partire da metionina e fenilalanina.

Sono definiti *aminoacidi condizionatamente essenziali* ([arginina](#), [glicina](#), [glutammina](#), prolina e [taurina](#)) quegli aminoacidi che ricoprono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'[omeostasi](#) e delle funzioni dell'organismo in determinate situazioni fisiologiche. In alcune condizioni patologiche questi aminoacidi possono non essere sintetizzati a velocità sufficiente per far fronte ai reali bisogni dell'organismo.

## *Le triplette di nucleotidi specificano gli aminoacidi*

**CONTENUTO IN AMINOACIDI ESSENZIALI:** si possono definire complete o nobili quelle proteine che contengono tutti gli AA essenziali in quantità e in rapporti equilibrati.

In generale le proteine animali sono complete e quelle vegetali sono incomplete.

La dicitura nobili associata alle proteine vegetali non è corretta ed è stata introdotta per contrastare il detto secondo il quale "i legumi sono la carne dei poveri".

In realtà assumere una discreta fonte di proteine vegetali nella dieta è importantissimo e per valorizzarle ulteriormente questo concetto è stato introdotto impropriamente il termine "nobili". In ogni caso queste carenze possono essere superate semplicemente utilizzando appropriate associazioni alimentari ad esempio pasta e fagioli. Si parla in questo caso di mutua integrazione perché gli aminoacidi di cui è carente la pasta vengono forniti dai fagioli e viceversa.

---

Il codice genetico è il linguaggio biologico, ovvero il linguaggio con cui tutte le cellule comunicano tra loro, trasmettendosi le informazioni relative a tutti i caratteri ereditabili e tipici di ciascuna specie

Come tutti i linguaggi, quindi, è costituito da un proprio alfabeto composto da lettere. Le lettere si associano tra loro a formare parole, e le parole, a loro volta, si associano a formare frasi di senso compiuto.

La frase quindi, rappresenta il messaggio completo e relativo a un singolo carattere. Una frase è contenuta in un GENE, e se, per il dogma della genetica, ad un gene corrisponde una proteina, significa che la frase rappresenta l'informazione relativa ad una proteina. Ossia, nel gene sono contenute le istruzioni, sotto forma di codice, per la produzione di una proteina.

---

*Lettere*



*sono solo 4*



**A C T G**

*Lettere*



*sono solo 4*



**A C T G**

*Parole*

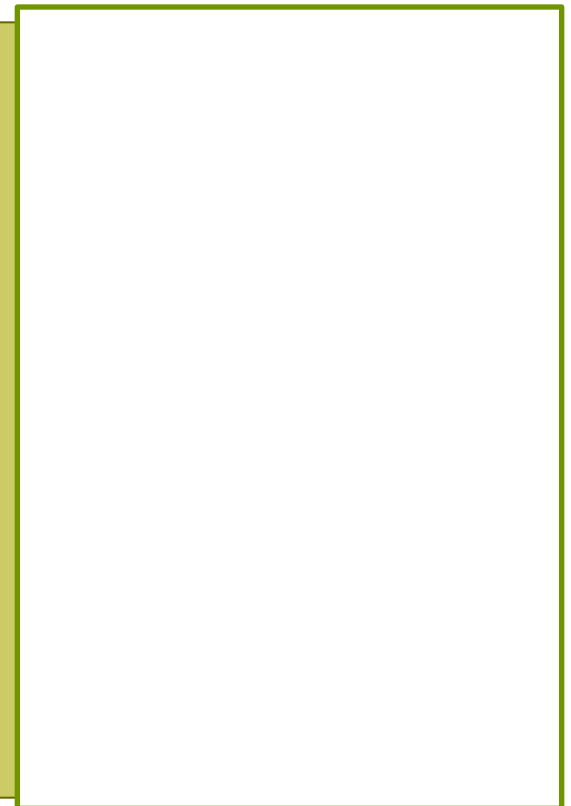


*Sono 64 triplette*

*o codoni*



**ACC ATA AGC**



*Lettere*



*sono solo 4*



**A C T G**

*Parole*



*Sono 64 triplette*

*o codoni*



**ACC ATA AGC**

*Frase*



*Sono infinite*



**...ATGACCATG....**

Questa tabella riporta i 64 codoni e gli amminoacidi corrispondenti ad ognuno di essi.

		seconda base			
		U	C	A	G
prima base	U	UUU fenilalanina UUC fenilalanina UUA leucina UUG leucina	UCU serina UCC serina UCA serina UCG serina	UAU tirosina UAC tirosina UAA <b>stop</b> ocra UAG <b>stop</b> ambra	UGU cisteina UGC cisteina UGA <b>stop</b> opale UGG triptofano
	C	CUU leucina CUC leucina CUA leucina CUG leucina	CCU prolina CCC prolina CCA prolina CCG prolina	CAU istidina CAC istidina CAA glutammina CAG glutammina	CGU arginina CGC arginina CGA arginina CGG arginina
	A	AUU isoleucina AUC isoleucina AUA isoleucina AUG metionina, <b>start</b>	ACU treonina ACC treonina ACA treonina ACG treonina	AAU asparagina AAC asparagina AAA lisina AAG lisina	AGU serina AGC serina AGA arginina AGG arginina
	G	GUU valina GUC valina GUA valina GUG valina	GCU alanina GCC alanina GCA alanina GCG alanina	GAU acido aspartico GAC acido aspartico GAA acido glutammico GAG acido glutammico	GGU glicina GGC glicina GGA glicina GGG glicina



# Il sistema HLA

---

Il sistema HLA comprende un complesso insieme di geni e i loro prodotti proteici

---

Gli antigeni HLA contribuiscono al riconoscimento "del proprio e del non-proprio" (self and nonself), alla risposta immune, agli stimoli antigenici e a coordinare l'immunità cellulare e umorale.

---

I geni HLA, che sono sistemati sul complesso maggiore di istocompatibilità (o MHC, Major Histocompatibility Complex) nel braccio corto del cromosoma 6, codificano per molecole glicoproteiche, che si rinvengono sulla membrana delle cellule.

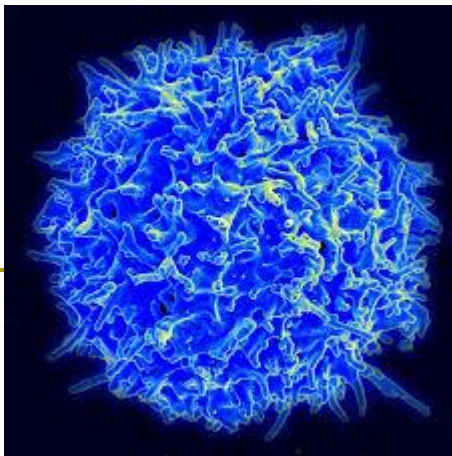
---

Le molecole HLA di Classe I si trovano:

sulle piastrine

su tutte le cellule nucleate del corpo.

I globuli rossi maturi non hanno, di norma, antigeni HLA dimostrabili con i metodi convenzionali, ma le cellule eritroidi immature li possiedono.

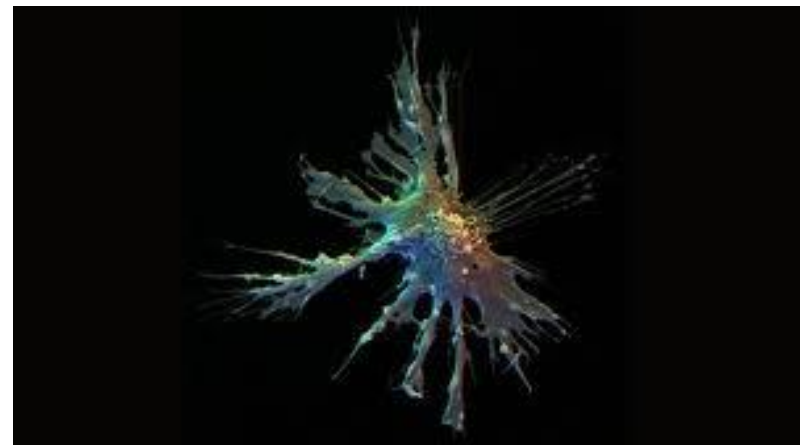
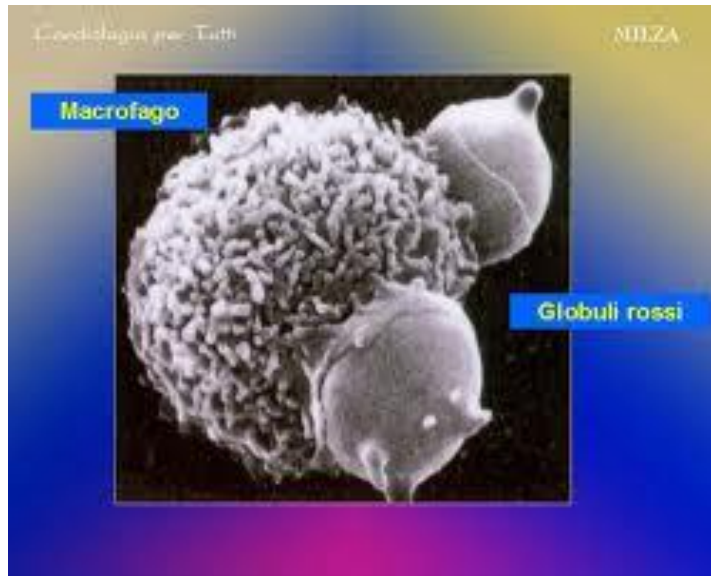


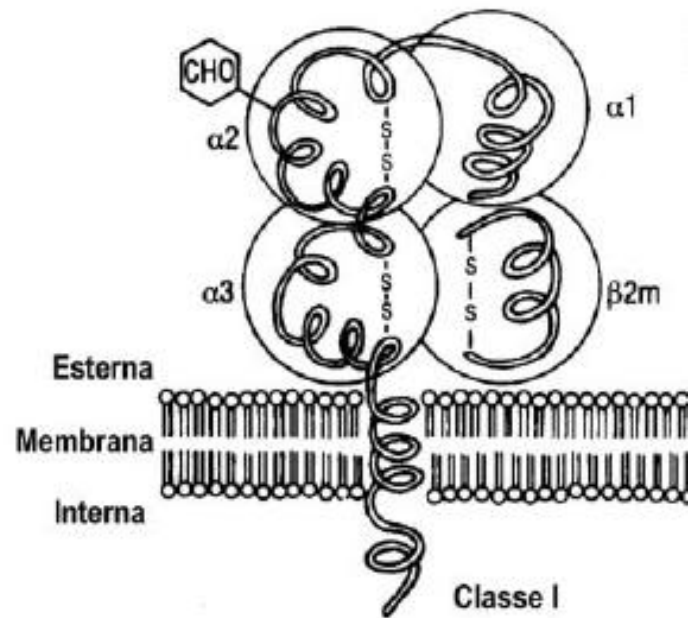
I linfociti sono cellule presenti nel sangue che costituiscono tra il 20 e il 40% dei leucociti

I macrofagi sono cellule immunitarie altamente differenziate nei vari tessuti dell'organismo, dove ricoprono il ruolo di "spazzini del corpo umano".

Le cellule dendritiche sono cellule che appartengono al sistema immunitario e hanno la funzione di presentare l'antigene ai linfociti B e T.

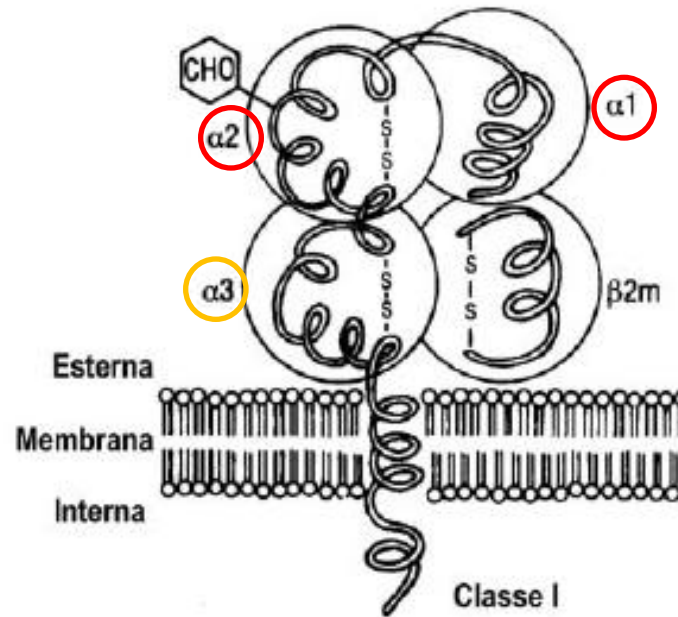
Gli antigeni di Classe II sono rinvenibili su alcuni tipi di cellule, le più importanti delle quali sono i linfociti, i macrofagi e le cellule dendritiche.





Gli antigeni HLA sono glicoproteine di membrana.

Le molecole di Classe I presentano due polipeptidi: una catena pesante, strettamente attaccata alla membrana, e una leggera, la β<sub>2</sub>-microglobulina.



La catena pesante attraversa la membrana cellulare, la  $\beta 2$ -microglobulina non è attaccata alla membrana ma è associata alla catena pesante attraverso il "dominio" invariabile  $\alpha 3$ , non legata covalentemente ad esso.

La porzione esterna della catena pesante è formata da 3 domini ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), dei quali i 2 più esterni ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) sono le regioni polimorfiche che conferiscono la specificità antigenica HLA.

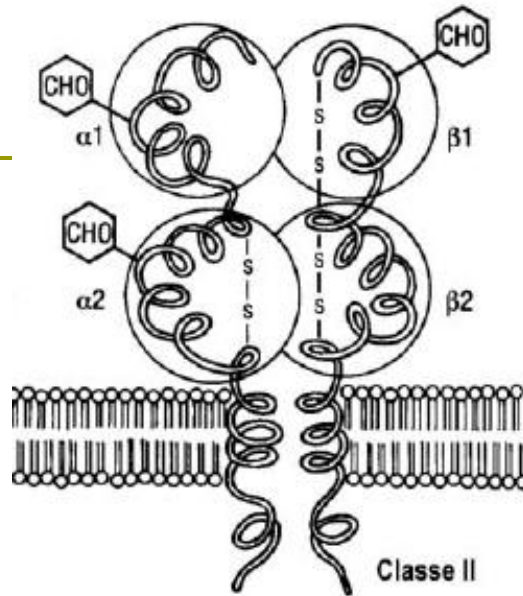
---

Le molecole di Classe I si rinvengono sulle piastrine e sulla maggior parte delle cellule nucleate dell'organismo, con alcune eccezioni, quali i neuroni, gli epitelii corneali, i trofoblasti e le cellule germinali. Soltanto quantitativi residuali si rinvengono negli eritrociti maturi, con alcuni tipi meglio espressi di altri.

Le piastrine esprimono principalmente gli antigeni HLA-A e HLA-B, mentre quelli HLA-C sono presenti a livello molto basso.

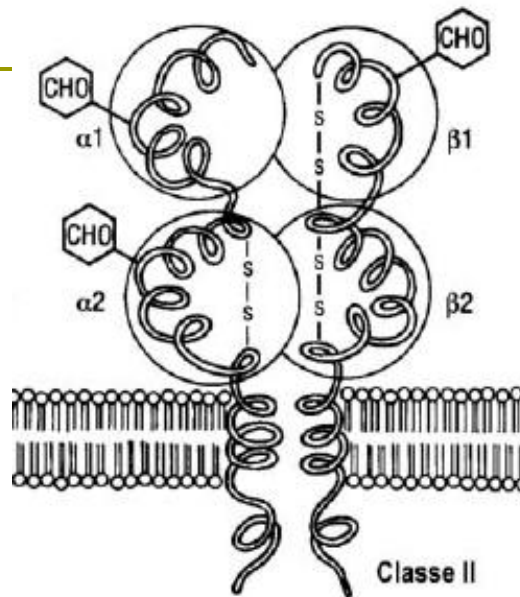
Gli antigeni di Classe II non sono presenti, generalmente, sulle piastrine.





Le molecole di Classe II sono composte da una catena  $\alpha$  e da una catena  $\beta$ , entrambe attaccate alla membrana cellulare.

La divisione in antigeni di Classe I e di Classe II si basa  
sulle funzioni,  
sulla distribuzione nei tessuti  
sulle caratteristiche biochimiche.



Gli antigeni di Classe II (HLA-DR, -DQ, e -DP) sono formati da due catene glicoproteiche strutturalmente simili, che attraversano, entrambe, la membrana.

La porzione extracellulare di ciascuna catena possiede due domini amminoacidici, il più esterno dei quali esprime la variabilità degli alleli di Classe II.

---

Gli antigeni di Classe II hanno una distribuzione più ristretta, rispetto a quelli di Classe I.

Sono espressi, essenzialmente, sui linfociti B, sui monociti, sulle cellule di derivazione monocitaria, quali i macrofagi e le cellule dendritiche, nonché sulle cellule dell'epitelio intestinale e delle prime cellule ematopoietiche.

Vi sono espressioni di antigeni di Classe II anche su alcune cellule endoteliali, specialmente quelle delle pareti interne nel microcircolo.

---

Gli antigeni HLA giocano un ruolo cruciale nella presentazione antigenica.

Il riconoscimento immunologico delle differenze fra antigeni HLA rappresenta, probabilmente, il primo passo verso il rigetto di un tessuto trapiantato.

---

Il sistema HLA è secondo, per importanza, soltanto al sistema ABO nell'influenzare la sopravvivenza a lungo termine di organi solidi trapiantati e di capitale importanza nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE).

---

Antigeni e anticorpi HLA sono anche importanti per alcune complicanze trasfusionali, quali

la refrattarietà piastrinica,

le reazioni febbrili non emolitiche,

la TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury, cioè lesione acuta polmonare correlata alla trasfusione),

la GvHD (Graft-versus-Host Disease) post-trapianto o post-trasfusionale.

---

Gli antigeni HLA di Classe I e II sono glicoproteine di membrana cellulare, prodotte da geni strettamente legati, mappati sul braccio corto del cromosoma 6.

---

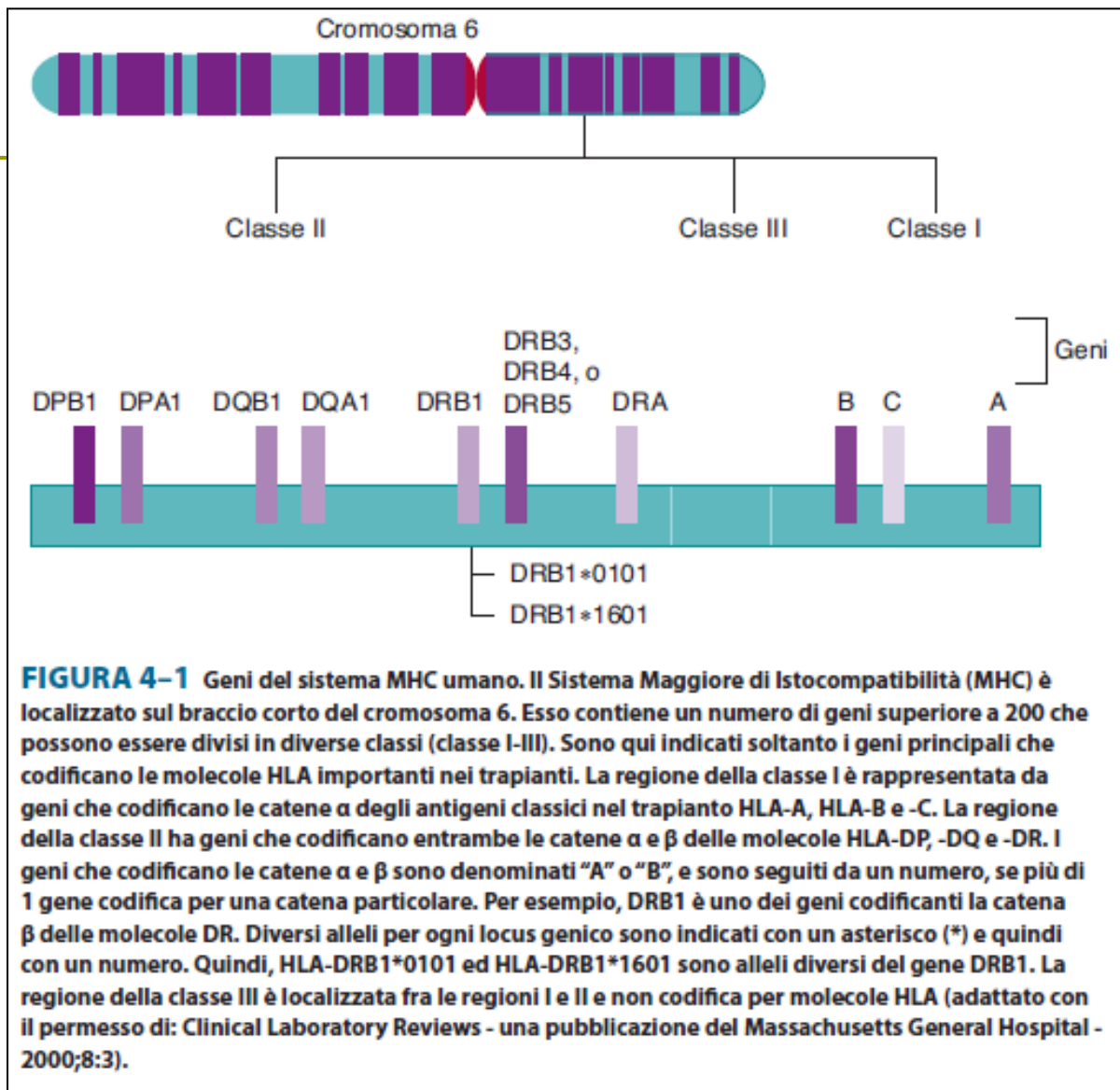
I geni HLA-A, HLA-B ed HLA-C codificano per i relativi antigeni (A, B, C) di **Classe I**.

I geni HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP codificano per i corrispondenti antigeni di **Classe II**.

Situati fra i geni di Classe I e di Classe II vi sono geni non-HLA che codificano per alcune proteine del complemento, per un enzima steroideo e per una citochina (TNF, Tumor Necrosis Factor).

Questa regione intermedia è denominata MHC di **Classe III**.





---

Sebbene l'organizzazione dell'MHC sia complessa, la sua ereditarietà segue i ben stabiliti principi della genetica.

Ogni persona ha due copie differenti di cromosoma 6 e, quindi, possiede due aplotipi HLA (i geni su ogni cromosoma), ognuno da ciascun genitore.

---

Ciascun figlio eredita una copia del cromosoma 6 da ognuno dei suoi genitori; ne consegue che anche gli aplotipi HLA derivano da ciascun genitore.

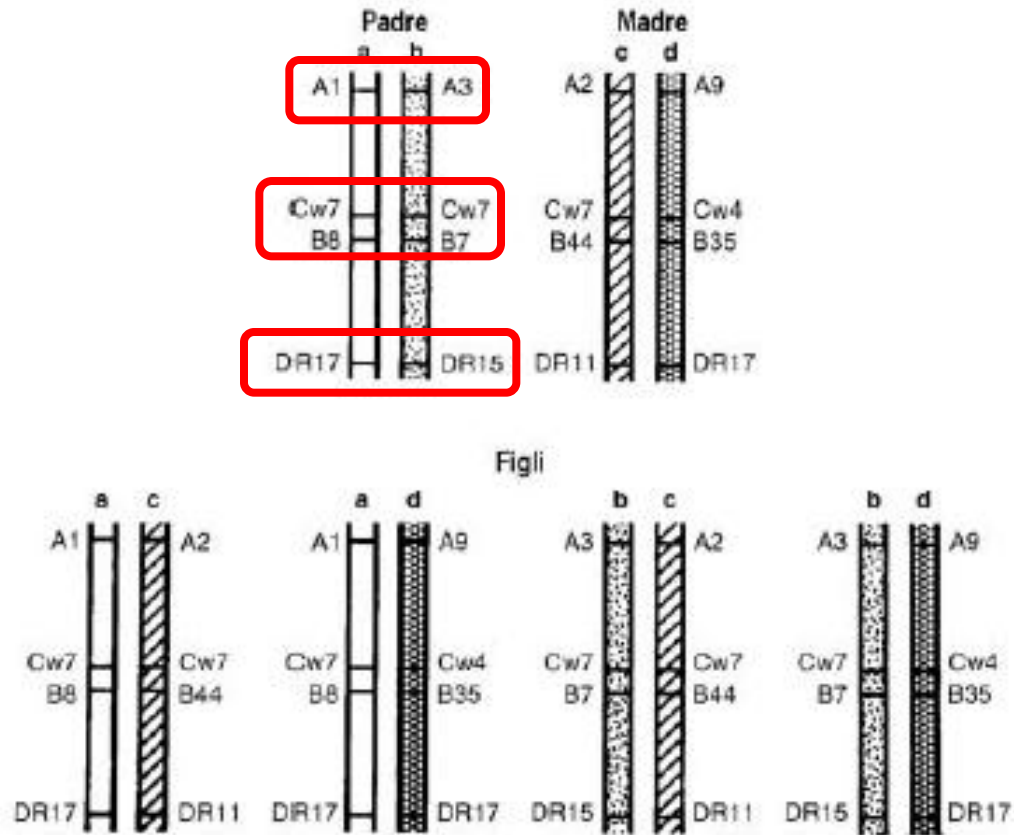
Tale schema di ereditarietà è importante nel predire se membri della famiglia potranno essere donatori compatibili ai fini di un trapianto.

---

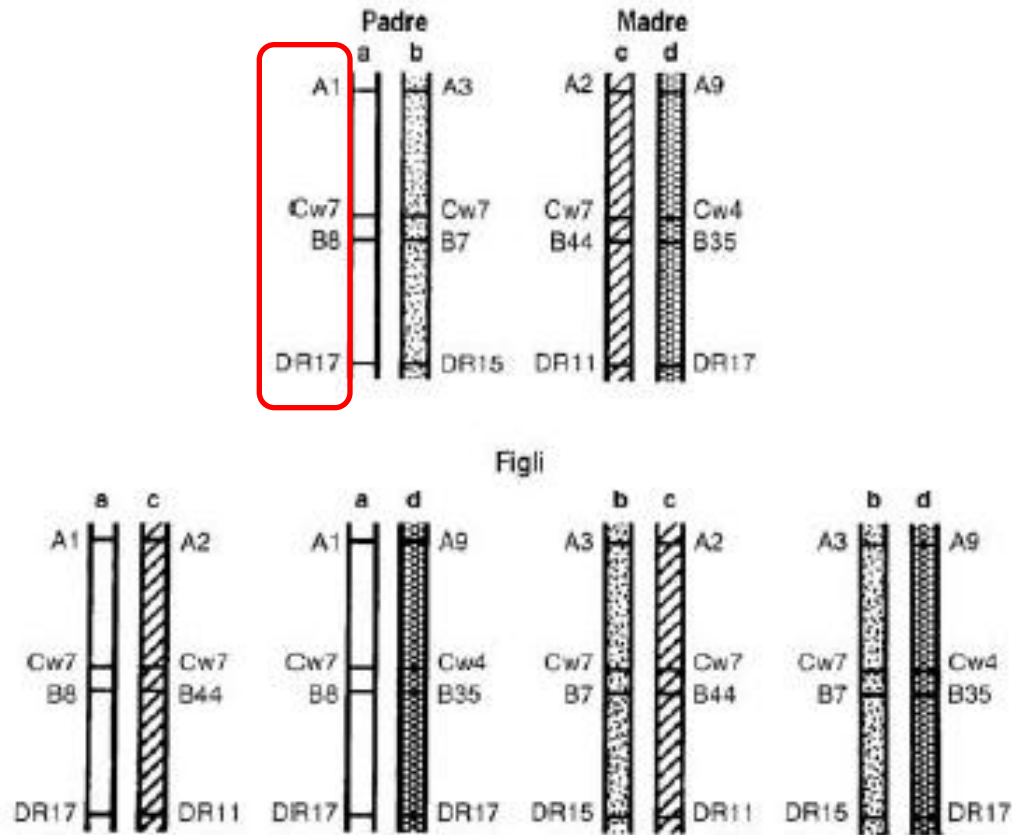
La probabilità che due fratelli possano essere HLA-identici è del 25%.

Avere due fratelli offre il 44% di probabilità di avere un fratello HLA-identico, mentre averne tre offre il 58%.

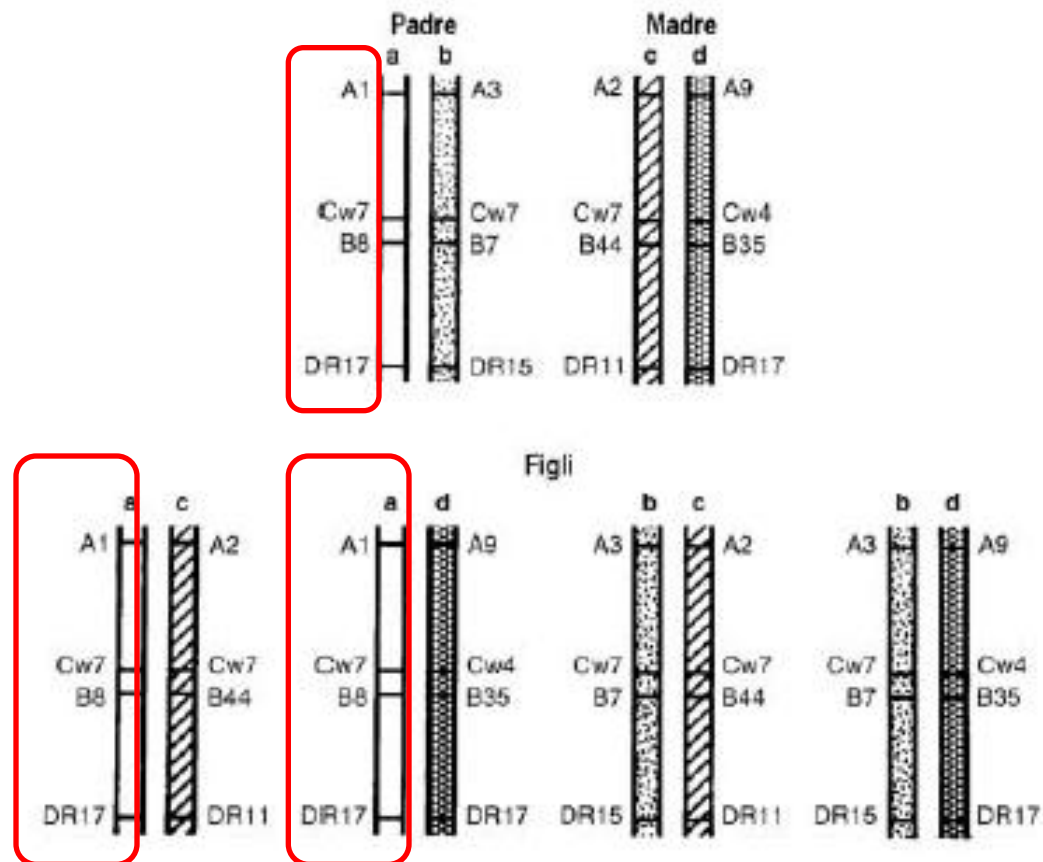
Anche avere molti fratelli non offrirà mai il 100% di possibilità.



**Figura 17.2** - I geni su ogni cromosoma costituiscono un aplotipo. Per identificare quali aplotipi possiede una persona, si deve conoscere quali antigeni presenta e anche le combinazioni ereditarie in una specifica famiglia. I risultati delle tipizzazioni indicano che il padre presenta questo fenotipo: A1,3; B7,8; Cw7-; DR15,17. Lo studio della famiglia rivela che gli aplotipi del padre sono: a = A1; Cw7; B8; DR17 e b = A3; Cw7; B7; DR15. La prole potrà avere soltanto una delle quattro possibili combinazioni aplotipiche, ammesso che non siano intervenuti *crossing-over*.



**Figura 17.2** - I geni su ogni cromosoma costituiscono un aplotipo. Per identificare quali aplotipi possiede una persona, si deve conoscere quali antigeni presenta e anche le combinazioni ereditarie in una specifica famiglia. I risultati delle tipizzazioni indicano che il padre presenta questo fenotipo: A1,3; B7,8; Cw7-; DR15,17. Lo studio della famiglia rivela che gli aplotipi del padre sono: a = A1; Cw7; B8; DR17 e b = A3; Cw7; B7; DR15. La prole potrà avere soltanto una delle quattro possibili combinazioni aplotipiche, ammesso che non siano intervenuti *crossing-over*.



**Figura 17.2** - I geni su ogni cromosoma costituiscono un aplotipo. Per identificare quali aplotipi possiede una persona, si deve conoscere quali antigeni presenta e anche le combinazioni ereditarie in una specifica famiglia. I risultati delle tipizzazioni indicano che il padre presenta questo fenotipo: A1,3; B7,8; Cw7-; DR15,17. Lo studio della famiglia rivela che gli aplotipi del padre sono: a = A1; Cw7; B8; DR17 e b = A3; Cw7; B7; DR15. La prole potrà avere soltanto una delle quattro possibili combinazioni aplotipiche, ammesso che non siano intervenuti *crossing-over*.

---

Di norma, entrambe le copie dei geni MHC si esprimono come antigeni, tuttavia, in certi soggetti, si può identificare un solo antigene.

Questo può accadere se

- il soggetto è omozigote per l'allele
- se non è disponibile l'antisiero relativo (si parla di allele blank, cioè vuoto).

È estremamente raro che l'assenza di un antigene derivi da un allele null.



---

Un allele null è dovuto a sostituzioni all'interno della regione codificante, con conseguente mancata espressione di una proteina funzionale sulla superficie cellulare.

L'inattivazione di un gene può essere determinata da sostituzioni nucleotidiche

da delezioni

da inserzioni

che causano una mancata sintesi dell'antigene.

Questa tabella riporta i 64 codoni e gli amminoacidi corrispondenti ad ognuno di essi.

		seconda base			
		U	C	A	G
prima base	U	UUU fenilalanina UUC fenilalanina UUA leucina UUG leucina	UCU serina UCC serina UCA serina UCG serina	UAU tirosina UAC tirosina UAA <b>stop</b> ocra UAG <b>stop</b> ambra	UGU cisteina UGC cisteina UGA <b>stop</b> opale UGG triptofano
	C	CUU leucina CUC leucina CUA leucina CUG leucina	CCU prolina CCC prolina CCA prolina CCG prolina	CAU istidina CAC istidina CAA glutammina CAG glutammina	CGU arginina CGC arginina CGA arginina CGG arginina
	A	AUU isoleucina AUC isoleucina AUA isoleucina AUG metionina, <b>start</b>	ACU treonina ACC treonina ACA treonina ACG treonina	AAU asparagina AAC asparagina AAA lisina AAG lisina	AGU serina AGC serina AGA arginina AGG arginina
	G	GUU valina GUC valina GUA valina GUG valina	GCU alanina GCC alanina GCA alanina GCG alanina	GAU acido aspartico GAC acido aspartico GAA acido glutammico GAG acido glutammico	GGU glicina GGC glicina GGA glicina GGG glicina

---

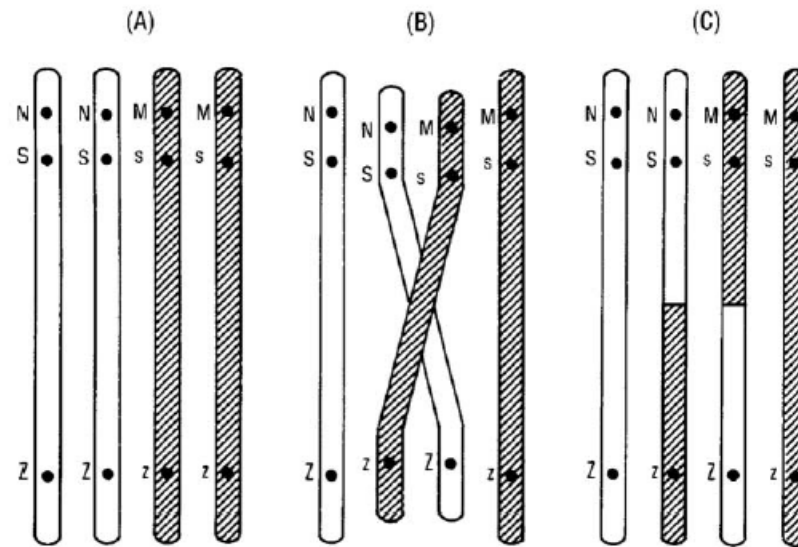
Nella trascrizione del fenotipo, la presenza di un allele blank viene indicata con una "x" (per il locus A)  
con una "y" (per il locus B)  
con "-" (per qualsiasi locus).

Per esempio, A1,x; B7,40     o A1,-;B7,40.

Per determinare il genotipo corretto, si devono effettuare studi familiari.

I geni della regione HLA possono, talora, mostrare fenomeni di crossing-over, quando frazioni di materiale genetico strettamente collegato si scambiano fra i cromosomi, durante la meiosi.

Le ricombinazioni vengono trasmesse alla prole, come nuovi aplotipi.



**Figura 10.6** - I loci strettamente concatenati sono raramente interessati dal *crossing-over*, così gli alleli di questi loci vengono ereditati insieme (N ed S, M ed s nell'esempio presentato). I loci dello stesso cromosoma non strettamente collegati (il locus Ss e il locus Zz) possono presentare il *crossing-over*. Il *crossing-over* è un tipo di ricombinazione. Avviene tra i cromatidi di cromosomi omologhi durante la meiosi, determinando la segregazione di alleli che sono posti sullo stesso cromosoma.

---

Le tecniche per individuare e investigare gli antigeni e gli alleli HLA rientrano in tre gruppi:

Test molecolari (DNA),  
test sierologici,  
test cellulari.

## **Metodi basati sul DNA**

La tipizzazione basata sul DNA presenta parecchi vantaggi rispetto a quelle sierologiche e cellulari:

alta sensibilità e specificità,  
piccoli volumi del campione,  
minor tempo di esecuzione, ridotto a poche ore,  
nessuna necessità di un'espressione antigenica alla superficie cellulare o di una vitalità della cellula.

**Tabella 17.2 - Metodiche di tipizzazione HLA e loro applicazioni cliniche**

<b>Metodo</b>	<b>Applicazioni cliniche</b>	<b>Livello</b>
SSP (PCR)	Trapianto di organi solidi o di CSE da donatori familiari o non apparentati	A livello sierologico e allelico, ampia risoluzione con primer
Sequenziamento del DNA	Trapianto di CSE da donatori non apparentati risoluzione di problemi di tipizzazione con altri metodi, caratterizzazione di nuovi alleli	A livello allelico
Ibridazione SSOP diretta	Trapianto di organi solidi e di CSE (può consentire un ampio numero di test)	A livello sierologico e allelico
Ibridazione SSOP inversa	Trapianto di organi solidi e di CSE da donatori familiari o non apparentati	A livello sierologico, ampia risoluzione con molte sonde
Microinfocitotossicità	Trapianto di organi solidi, valutazione della refrattarietà piastrinica, tipizzazione (della sola Classe I) di piastrine di donatori e riceventi	Specificità sierologiche

SSP-PCR = reazione polimerasica a catena con innesco sequenza-specifico (*Sequence-specific priming-polymerase chain reaction*); SSOP = sonda oligonucleotidica sequenza-specifica (*Sequence-specific oligonucleotide probe*); CSE = cellule staminali ematopoietiche.

## ***Test sierologici***

Per tipizzare gli antigeni HLA-A, -B, -C, -DR e -DQ, si può impiegare il test di microlinfocitotossicità.

Nel test si utilizzano linfociti, perché facilmente ottenibili dal sangue periferico anticoagulato e perché danno, a differenza dei granulociti, risultati riproducibili. Si possono anche usare linfociti ottenuti dai linfonodi o dalla milza.

I primi sieri tipizzanti sono stati ottenuti da donne multipare; sono anche disponibili alcuni sieri monoclonali murini.

I sieri a specificità HLA nota sono sistemati nei pozzetti di una micropiastra test.

Ad ogni pozzetto si aggiungono i linfociti in esame, poi si aggiunge complemento di coniglio e, se una quantità sufficiente di anticorpi si è legata alla membrana linfocitarie, si attiverà la cascata complementare, con attacco alla superficie cellulare e conseguente linfocitotossicità.

Il danno cellulare può essere visionato dall'aggiunta di un colorante: le cellule che non hanno anticorpi adesi alla membrana non attivano il complemento e la mancanza di lesioni alla membrana mantiene fuori della cellula il colorante vitale, mentre le cellule con membrana danneggiata gli permetteranno di entrare.

L'individuazione dell'esclusione o dell'assorbimento del colorante viene effettuata impiegando un microscopio a contrasto di fase.

Qualora sia disponibile un microscopio a fluorescenza, si possono utilizzare coloranti vitali fluorescenti.

---

### ***Test cellulari***

Inizialmente, la coltura linfocitarie mista (o MLC, *Mixed Lymphocyte Culture*), detta anche *cultura leucocitaria mista* o *reazione linfocitaria mista*, è stata usata per individuare le differenze genetiche nella regione di Classe II.

Nella MLC, si coltivano insieme linfociti provenienti da soggetti diversi, dando loro la possibilità di riconoscere antigeni HLA-D differenti e di rispondere proliferando.



---

## **Sistema HLA e trasfusione**

Antigeni e anticorpi HLA giocano un ruolo importante nelle attività trasfusionali.

Sono, infatti, coinvolti nell'immunizzazione e nelle refrattarietà piastriniche, nelle reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche, nella TRALI, nella GvHD post-trasfusionale.

Gli antigeni HLA sono fortemente immunogeni.

In seguito a gravidanze, trasfusioni o trapianti, è molto più probabile che un normale soggetto immunocompetente formi anticorpi contro antigeni HLA piuttosto che contro antigeni di altri sistemi.

---

## **Sistema HLA e trapianti**

Le indagini HLA sono parte integrale dei trapianti d'organo.

L'estensione di queste indagini dipende dai diversi tipi di trapianto.

---

### ***Trapianti di cellule staminali ematopoietiche***

Da molto tempo, si è stabilito che le differenze HLA fra donatore e ricevente rappresentano un'importante barriera al successo di un trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Al contrario, similarità e compatibilità sono necessarie all'attecchimento del trapianto e per prevenire la GvHD.

I potenziali donatori e i riceventi vengono tipizzati per gli antigeni HLA-A, -B, -C, -DR e -DQ.

Lo scopo è quello di armonizzare, il più possibile, gli alleli del candidato donatore con quelli del ricevente a livello dei *loci* HLA-A, -B e DRB1, essendo l'accoppiamento migliore quello a livello allelico.

Alcuni programmi di trapianto aggiungono anche i dati sugli alleli *HLA-C* e *-DQ*.

---

### ***Trapianti di cellule staminali ematopoietiche***

Per stabilire una compatibilità ottimale per gli antigeni di Classe I e II, si ricorre alle tipizzazioni molecolari.

Sebbene i fratelli HLA-identici restino la scelta migliore per i trapianti di CSE, aumenta sempre il numero di donatori non apparentati, che si ricercano fra i 5 milioni di volontari elencati nel registro del *National Marrow Donor Program* (NMDP).

L'impiego di CSE del cordone ombelicale e di CSE che sono state depletate dalle cellule T, può consentire maggiori compatibilità fra donatori e riceventi.

## ***Trapianti di rene e di pancreas***

La compatibilità ABO è il fattore più importante per determinare la sopravvivenza immediata di un rene trapiantato. Dato che gli antigeni ABH sono espressi, in vario grado, su tutte le cellule dell'organismo, l'organo ABO incompatibile trapiantato viene in contatto, continuamente, con gli anticorpi ABO del ricevente.

Di particolare importanza è l'espressione degli antigeni ABH sugli endoteli vascolari, la vascolarizzazione del trapianto è il punto di rigetto più comune.

Di solito, donatore e ricevente sono indagati per gli antigeni ABO, HLA-A, -B, -DQ; di solito si testano anche gli antigeni HLA-C e -DQ.

Prima di passare all'intervento, è richiesto un *crossmatch fra il siero del ricevente e i linfociti* del donatore.

---

### ***Altri trapianti di organi solidi***

Per i trapianti di fegato, cuore, polmone e cuore/polmone, la compatibilità ABO resta essenziale per la scelta del donatore e la determinazione, prima del trapianto, di tale compatibilità è vincolante.

È anche richiesta la tipizzazione HLA-A, -B e -DR del candidato ricevente e, sempre prima del trapianto, deve essere disponibile una prova crociata qualora il ricevente abbia mostrato una pre-sensibilizzazione, eccetto che nei casi di massima urgenza.

**TABELLA 4-2** Richieste per la corrispondenza HLA e gruppi sanguigni ABO nei trapianti

Gene HLA	HLA	ABO
Rene	No*	Si
Cornea	No	No
Fegato	No	Si
Cuore	No	Si
Polmone	No	Si
Pancreas	No	Si
Cuore	No*	Si
Cellule staminali/midollo osseo	Si	No

\*HLA Matched preferibile ma non richiesto.

---

## **Test di paternità e altre indagini forensi**

La tipizzazione HLA (in particolare quella molecolare) si è dimostrata utile per le indagini forensi.

Nei test di paternità, essa è in grado di escludere, da sola, circa il 90% dei maschi falsamente accusati.

Insieme alle tipizzazioni eritrocitarie, il tasso di esclusione sale al 95% .



---

## **HLA e malattie**

Per alcune malattie, soprattutto per quelle che riconoscono una eziologia autoimmune, esiste un'associazione fra fenotipo HLA e la condizione morbosa.

Le malattie associate all'HLA hanno molti aspetti in comune.

---

## **HLA e malattie**

Sono note per essere (o sospettate di essere) ereditarie, hanno un decorso clinico contraddistinto dall'alternarsi di esacerbazioni e di remissioni, hanno (usualmente) le caratteristiche delle malattie autoimmuni e la loro esatta eziopatogenesi è ignota.

Si sono accumulate evidenze che le stesse molecole HLA siano implicate nella suscettibilità alla malattia.

Tabella 27.3

Esempi di malattie HLA-associate

Malattia	HLA associato
Spondilite anchilosante	B27
Tiroidite sub-acuta	B35
Tiroidite di Hashimoto	DR3, DR4, DQ5
Malattia di Graves	DR3
Miastenia grave	DR3
Malattia di Addison	DR3
Artrite Reumatoide	DR4
Malattia Celiaca	DQ2, DQ8
Narcolessia	DQ6
Sclerosi Multipla	DQ6
Diabete tipo I	DR3, DR4
Psoriasi	Cw6
Sindrome di Goodpasture	DR15
Lupus eritematoso sistemico	DR3, DR15
Pemphigus vulgaris	DR4
Epatite autoimmune	DR3, DR13
Sindrome di Behçet	B51
Sindrome di Ménière	Cw4
Anemia perniciosa	A2, A3, B7
Periodontite aggressiva	A24
Sarcoidosi	DR15

Spondilite anchilosante: malattia infiammatoria cronica che colpisce soprattutto la colonna vertebrale e le articolazioni sacroiliache del bacino.  
Può variare da una forma lieve a malattia cronica ingravescente, portando a rigidità, perdita di funzione e deformità della colonna vertebrale

---

La tipizzazione HLA ha, tuttavia, una valenza limitata nell'assegnare il rischio per molte malattie, perché la loro associazione è incompleta, dando spesso risultati falsamente negativi o falsamente positivi.

Spondilite anchilosante: malattia infiammatoria cronica che colpisce soprattutto la colonna vertebrale e le articolazioni sacroiliache del bacino.  
Può variare da una forma lieve a malattia cronica ingravescente, portando a rigidità, perdita di funzione e deformità della colonna vertebrale

---

La tipizzazione HLA ha, tuttavia, una valenza limitata nell'assegnare il rischio per molte malattie, perché la loro associazione è incompleta, dando spesso risultati falsamente negativi o falsamente positivi.

L'associazione fra HLA-B27 e la spondilite anchilosante è, a proposito di soggetti caucasici, altamente istruttiva:

più del 90% dei pazienti affetti possiede l'antigene HLA-B27.

Spondilite anchilosante: malattia infiammatoria cronica che colpisce soprattutto la colonna vertebrale e le articolazioni sacroiliache del bacino.  
Può variare da una forma lieve a malattia cronica ingravescente, portando a rigidità, perdita di funzione e deformità della colonna vertebrale

---

La tipizzazione HLA ha, tuttavia, una valenza limitata nell'assegnare il rischio per molte malattie, perché la loro associazione è incompleta, dando spesso risultati falsamente negativi o falsamente positivi.

L'associazione fra HLA-B27 e la spondilite anchilosante è, a proposito di soggetti caucasici, altamente istruttiva:

più del 90% dei pazienti affetti possiede l'antigene HLA-B27.

D'altro canto, la specificità è bassa:  
soltanto un 20% dei soggetti con l'antigene B27 svilupperà la spondilite.

---

Altra situazione:

la narcolessia è fortemente associata all'allele HLA *DQB1\*060237*.

La Narcolessia è una malattia ad eziologia sconosciuta caratterizzata da eccessiva sonnolenza diurna che, nella forma più caratteristica, si associa a "cataplessia" (ovvero di una rapida perdita del tono muscolare) e ad altri fenomeni dovuti alla emergenza atipica del sonno REM, quali le "allucinazioni ipnagogiche (esperienze sensoriali intense e vivide, talora a contenuto terrifico, che si verificano all'inizio o alla fine di un periodo di sonno) e le "paralisi del sonno" (caratterizzate dalla consapevolezza di non riuscire a muoversi malgrado il desiderio di farlo)

---

Altra situazione:

la narcolessia è fortemente associata all'allele HLA *DQB1\*060237*.

Come nel caso precedente, oltre il 90% degli affetti da narcolessia possiede l'allele *DQB1\*0602*,

La Narcolessia è una malattia ad eziologia sconosciuta caratterizzata da eccessiva sonnolenza diurna che, nella forma più caratteristica, si associa a "cataplessia" (ovvero di una rapida perdita del tono muscolare) e ad altri fenomeni dovuti alla emergenza atipica del sonno REM, quali le "allucinazioni ipnagogiche (esperienze sensoriali intense e vivide, talora a contenuto terrifico, che si verificano all'inizio o alla fine di un periodo di sonno) e le "paralisi del sonno" (caratterizzate dalla consapevolezza di non riuscire a muoversi malgrado il desiderio di farlo)



---

Altra situazione:

la narcolessia è fortemente associata all'allele HLA *DQB1\*060237*.

Come nel caso precedente, oltre il 90% degli affetti da narcolessia possiede l'allele *DQB1\*0602*,

***ma* soltanto una minoranza di soggetti con questo marcatore sviluppa la malattia.**

La Narcolessia è una malattia ad eziologia sconosciuta caratterizzata da eccessiva sonnolenza diurna che, nella forma più caratteristica, si associa a "cataplessia" (ovvero di una rapida perdita del tono muscolare) e ad altri fenomeni dovuti alla emergenza atipica del sonno REM, quali le "allucinazioni ipnagogiche (esperienze sensoriali intense e vivide, talora a contenuto terrifico, che si verificano all'inizio o alla fine di un periodo di sonno) e le "paralisi del sonno" (caratterizzate dalla consapevolezza di non riuscire a muoversi malgrado il desiderio di farlo)