



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesi doctoral

Aplicació de les noves tecnologies de seqüenciació massiva en la millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: gens HLA i polimorfisme *CCR5-Δ32*

Presentada per

Emma Enrich Randé

Directors: Francesc Rudilla Salvador i Sergi Querol Giner

Tutor: Iñaki Álvarez Pérez

Doctorat en Immunologia Avançada

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

2019



Tesi doctoral

Aplicació de les noves tecnologies de seqüenciació massiva en la millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: gens HLA i polimorfisme *CCR5-Δ32*

Memòria presentada per

Emma Enrich Randé

Programa de Doctorat en Immunologia Avançada

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, setembre 2019

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Francesc Rudilla Salvador i del Dr. Sergi Querol Giner, i sota la tutorització del Dr. Iñaki Álvarez Pérez.

Francesc Rudilla Salvador

Sergi Querol Giner

Emma Enrich Randé

Als meus pares

*There is freedom waiting for you,
on the breezes of the sky
And you ask "What if I fall?"
Oh but my darling,
what if you fly?*

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair als meus directors, Francesc i Sergi, l'oportunitat que m'han donat per realitzar aquesta tesi i per poder aprendre tot el que après durant aquests anys. Especialment, Francesc, voldria agrair-te la teva confiança, en mi i en la meva feina. Això m'ha fet sentir segura i contenta del que faig. Fran, també me gustaria agraderer tu confianza y toda tu ayuda siempre que la he necesitado.

Nina, gràcies per ensenyar-me quan vaig arribar al laboratori i per fer-m'hi sentir a gust. Per les estones de tren o a la muntanya, pels sopars amb *anxovetes* i per venir sempre a veure'm.

Eva, gràcies pel teu gran suport i per ser una bona amiga. Em sembla que, si no fos per tu, encara estaria analitzant cordons... o barallant-me amb els *primers* d'HLA. Potser també li hauré d'agrair al *DQB1*03* l'oportunitat que m'ha donat per aprendre, amb tu i de tu. Laura, gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat i per fer-me sentit una més al laboratori.

Laia!! Gràcies per la teva energia i vitalitat. Per escoltar-me, per ajudar-me a guardar mostres al *kardex*, per fer-me riure i per deixar-me *apretar* el teu braç quan estic nerviosa o contenta. Laura, avui t'envio una abraçada. Gràcies per preguntar-me com estic i per fer-me sentir propera a tu. Iris, gràcies per explicar-me tantes coses, de les orenetes, de les crasses o d'estadística. Per regalar-me el teu temps sempre que necessito que m'ajudis. No he pogut tenir unes millors companyes de despatx!!!

També voldria agrair a tot l'equip de Coagulopaties Congènites, per acollir-me quan vaig arribar a la tercera planta i per la vostra disposició per ajudar sempre. I al laboratori d'HLA, als que en formeu part ara i als que n'heu format part durant aquest temps, per la vostra col·laboració en aquest projecte i per les estones compartides. Equip de les hamacas! Gràcies per les xerrades post-dinar i les estones de cafè, encara que aquests últims mesos les he trobat una mica a faltar.

Lluís, gràcies per les hores compartides als congeladors de la -1 i tot el teu suport en el... GESCU!! També voldria agrair a totes aquelles persones del banc de cordó i del REDMO que m'han respost tantes preguntes o enviat dades, així com a tots els centres de trasplantament que han contribuït en respondre els qüestionaris.

A les meves amigues, les que tinc a prop i les que tinc més lluny. Amb les que, des de la guarderia, seguim caminant juntes. I a les que, com les estrelles, sempre hi són encara que no es vegin.

També a tu, Marc. Per patir una mica amb mi aquesta tesi i per la teva comprensió en tot. Però sobretot, gràcies per la teva il·lusió contagiosa. Per la vida i per mi.

Mare, gràcies per ser tan bona, tan dolça i per cuidar-me tant. Pare, un dia em vas dir que tu i la mare seríeu de les poques persones que estaríeu sempre al meu costat. Que bonic saber del cert que això sempre és i serà així.

PREFACI

La present tesi doctoral s'ha desenvolupat al Banc de Sang i Teixits i ha estat resultat d'un projecte conjunt entre el Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica, el Laboratori de Coagulopaties Congènites i el banc de sang de cordó umbilical.

El banc de sang de cordó umbilical de Barcelona és un banc públic que va iniciar-se l'any 1995 i que lidera el programa Concordia, una iniciativa cooperativa interterritorial que té com a objectiu coordinar la donació de sang de cordó umbilical. Aquest projecte compta amb 50 maternitats procedents de 6 comunitats autònomes espanyoles (Aragó, Cantàbria, Catalunya, Extremadura, Illes Balears i Navarra) i del Principat d'Andorra. El banc de cordó de Barcelona és un dels més actius d'Europa i del món, amb prop 2.000 unitats trasplantades. Actualment, disposa de més de 20.000 unitats, que es troben disponibles al Registre de Donants de Medul·la Òssia a escala nacional, així com als registres internacionals.

La necessitat de disposar d'un inventari d'unitats de sang de cordó umbilical d'elevada qualitat, juntament amb la incorporació de les tecnologies de seqüenciació de nova generació al Banc de Sang i Teixits, van obrir la porta a la proposició d'aquest projecte i al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral.

ÍNDIX

RESUM	15
ABSTRACT	17
ABREVIACIONS	19
INTRODUCCIÓ	21
1. El sistema HLA	23
1.1 El sistema HLA: organització i funció.....	23
1.2 Estructura de les molècules HLA.....	26
1.3 Importància clínica de les molècules HLA	28
1.4. Tipificació HLA	31
1.4.1 Nomenclatura HLA.....	31
1.4.2 Tècniques clàssiques per a la tipificació HLA.....	32
1.4.3 Seqüenciació de nova generació i tipificació HLA	33
2. El polimorfisme <i>CCR5-Δ32</i>	36
2.1 HIV i polimorfisme <i>CCR5-Δ32</i>	36
2.2 Implicació en el trasplantament hematopoètic	37
3. El trasplantament hematopoètic.....	39
3.1 Hematopoesi	39
3.2 Trasplantament hematopoètic	41
3.3 Efectes de l'empelt sobre l'hoste: GVHD i GVL	43
4. La sang de cordó umbilical pel trasplantament hematopoètic	44
4.1 El cordó umbilical	44
4.2 Des del primer trasplantament a la creació dels bancs de cordó	45
4.3 Recollida i processament de la sang de cordó umbilical.....	47
4.4 Característiques de les cèl·lules de la sang de cordó umbilical	48

4.5 Peculiaritats del trasplantament de sang de cordó umbilical.....	50
4.5.1 Empelt hematopoètic i recuperació immunitària.....	50
4.5.2 Estratègies per millorar l'empelt hematopoètic i la recuperació immunitària..	52
4.5.3 Incidència i severitat de GHVD	54
4.6 Criteris per a la selecció de les unitats pel trasplantament	55
4.6.1 Dosi cel·lular i compatibilitat HLA.....	55
4.6.2 HLA matern: determinació dels NIMAs	59
4.6.3 Polimorfisme <i>CCR5-Δ32</i>	62
4.6.4 Altres criteris: ABO, sexe, KIR i IPAs	62
4.7 Evolució del trasplantament de sang de cordó umbilical.....	64
4.8 Altres usos de la sang de cordó umbilical.....	66
OBJECTIUS	69
RESULTATS	73
<u>Secció 1:</u> Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: polimorfisme <i>CCR5-Δ32</i>	77
Article 1: Analysis of the Spanish <i>CCR5-Δ32</i> inventory of cord blood units: lower cell counts in homozygous donors.	79
<u>Secció 2:</u> Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: gens HLA	81
Article 2: Improving cord-blood typing with next generation sequencing: impact of allele-level HLA and NIMA determination on their selection for transplantation	83
Article 3: HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies: An analysis of umbilical cord blood units at the Barcelona Cord Blood Bank.....	127
Article 4: Identification of the novel HLA-B*57:91 allele, by next-generation sequencing in a Spanish individual.	129
Article 5: HLA-DQB1*02:102, a novel allele identified by next generation sequencing in a Spanish individual.	131
DISCUSSIÓ	133
BIBLIOGRAFIA	155

RESUM

La sang de cordó umbilical és una font de cèl·lules mare pel trasplantament hematopoètic. Tot i el menor grau de compatibilitat HLA que s'ha acceptat, històricament, per aquest tipus de trasplantament, s'ha demostrat que tenir en compte els gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1* en alta resolució s'associa amb millors resultats de trasplantament. Actualment, es recomana aquest grau de compatibilitat, així com considerar els antígens HLA materns no heretats o NIMA, quan existeix una incompatibilitat entre la unitat de cordó i el receptor. D'altra banda, també s'ha proposat utilitzar unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, el qual confereix resistència a la infecció del HIV, per aquells pacients HIV⁺ que requereixin un trasplantament. Per tot això, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat millorar la caracterització de les unitats de més bona qualitat cel·lular del programa Concordia, mitjançant la determinació del polimorfisme *CCR5-Δ32* i la tipificació dels gens HLA. La caracterització del gen *CCR5* en més de 8.000 unitats del banc, ha permès determinar 54 unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, les quals formen part d'un inventari de 130 unitats homozigotes identificades al registre espanyol. Altrament, s'ha desenvolupat i validat satisfactòriament una estratègia de tipificació HLA de molt baix cost basada en la seqüenciació de nova generació, que permet la tipificació en alta resolució dels gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1*, així com la caracterització simultània del polimorfisme *CCR5-Δ32*. Aquesta estratègia s'ha implementat en la tipificació de més de 5.000 unitats de cordó del banc i 2.500 mostres maternes associades. Això ha permès realitzar el primer estudi de freqüències HLA del banc de cordó de Barcelona i el més extens realitzat fins al dia d'avui en la població espanyola. Finalment, s'ha analitzat l'impacte de l'alta resolució de les unitats de cordó i la tipificació HLA materna en la seva selecció preferent pel trasplantament. Per aquesta finalitat, s'ha realitzat un seguiment, de fins a 17 mesos, de tres grups d'estudi formats per 2.012 unitats cadascun. Les unitats del primer grup, així com les seves respectives mostres maternes, presenten una tipificació en alta resolució en *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1*. Les unitats del segon grup també presenten una tipificació HLA en alta resolució, però no tipificació materna, mentre que les unitats del darrer grup es troben tipificades d'acord amb els criteris de selecció convencionals: baixa resolució en *HLA-A* i *-B* i alta resolució en *HLA-DRB1*. Tot i que s'ha observat una major tendència a seleccionar les unitats amb tipificació HLA en alta resolució i tipificació materna, no s'ha pogut demostrar un impacte significatiu de les variables estudiades en la selecció preferent de les unitats. Els resultats d'aquest estudi, probablement influenciats per la disminució del trasplantament de cordó en els últims anys, posen de manifest la necessitat de disposar d'uns criteris de selecció de la sang de cordó ben establerts i reconeguts de manera global,

basats en les evidències científiques, així com d'incrementar l'accessibilitat dels clínics a la informació disponible als registres de donants. En conjunt, el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, on les tecnologies de seqüenciació de nova generació hi han tingut un paper cabdal, ha permès millorar la caracterització de l'inventari de cordons del programa Concordia, el que facilita 1) la utilització d'unitats *CCR5-Δ32* per pacients HIV⁺ que requereixen un trasplantament hematopoètic, 2) la selecció de les unitats de cordó d'acord amb els criteris de compatibilitat HLA recomanats actualment i 3) la utilització de la compatibilitat NIMA en estudis prospectius. Així també, ha permès disposar d'un estudi de freqüències HLA en alta resolució, representatiu de la cohort de cordons del banc, però també de la població espanyola.

ABSTRACT

Umbilical cord blood is a rich source of stem cells useful for hematopoietic transplantation. Although this kind of transplantation is historically considered to need a lower level of HLA compatibility, high-resolution matching at *HLA-A*, *-B*, *-C* and *-DRB1* genes has been associated to better transplantation outcomes. Nowadays, it is recommended to reach this level of compatibility as well as take into consideration the non-inherited maternal antigens or NIMA if a mismatch between the recipient and the cord blood unit exists. Otherwise, the use of cord blood units homozygous for *CCR5-Δ32* polymorphism has been recommended for HIV⁺ patients undergoing a hematopoietic transplantation, in order to confer resistance to the viral infection. For all these reasons, the main objective of the present thesis pursued to improve the characterization of the cord blood units with highest cellular quality in Concordia programme by *CCR5-Δ32* polymorphism and HLA genes typing. *CCR5* gene was characterized in more than 8,000 cord blood units, 54 of which were homozygous for *CCR5-Δ32* polymorphism and became part of the 130 homozygous units in the Spanish registries. In addition, a low-cost strategy based on next generation sequencing technology for simultaneous HLA (*-A*, *-B*, *-C* and *-DRB1*) and *CCR5-Δ32* polymorphism determination was developed and successfully validated. This novel strategy was used for the characterization of more than 5,000 cord blood units and 2,500 associated maternal samples, which supposed the first analysis of HLA frequencies in the Cord Blood bank of Barcelona and the largest one performed so far in the Spanish population. Moreover, this thesis assessed the impact of high-resolution and maternal HLA determination on the odds of cord blood units to be selected for hematopoietic transplantation. To this end, three study groups composed by 2,012 cord blood units each were monitored for up to 17 months. The units and associated maternal samples of the first group had a high-resolution determination of *HLA-A*, *-B*, *-C* and *-DRB1*. In the second group, units presented high-resolution determination of HLA genes but lacked maternal HLA information, while the units in third group were characterized following conventional criteria: low-resolution sequencing for *HLA-A* and *-B* and high-resolution sequencing for *HLA-DRB1*. Despite a trend toward a greater selection of units with high-resolution and maternal typing, we failed to demonstrate a significant impact of the analysed variables on the eligibility of these units. The results from this study were probably influenced by the decrease in the number cord blood transplantations during last years. Nevertheless, these results highlight the strong need for well-established, evidence-based and globally accepted criteria for the selection of umbilical cord blood, as well as the necessity to improve the accessibility of clinicians to the information available in the donor public registries. Altogether, with the help of next

generation sequencing techniques, the present thesis contributed to improve the characterization of the CBU inventory in Concordia programme, by facilitating 1) the use of cord blood units containing *CCR5-Δ32* polymorphism for HIV⁺ patients undergoing a hematopoietic transplantation, 2) the selection of cord blood units based on the currently recommended HLA histocompatibility criteria, and 3) the use of NIMA histocompatibility in prospective studies. In addition, this thesis includes the first study of HLA frequencies determined by high-resolution sequencing, large enough to be representative of the Spanish population.

ABREVIACIONS

AIDS	Síndrome de la immunodeficiència adquirida
APC	Cèl·lula presentadora d'antígens
ARS	Solc d'unió al pèptid
ART	Teràpia antiretroviral
ATG	Globulina antitimocítica
BM	Medul·la òssia
CCR5	Receptor de quimiocines de tipus 5
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CXCR4	Receptor de quimiocines de tipus 4
DC	Cèl·lula dendrítica
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
FACT	<i>Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy</i>
G-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits
GVHD	Malaltia de l'empelt contra l'hoste
GVL	Empelt contra la leucèmia
HIV	Virus de la immunodeficiència humana
HLA	Antigen leucocitari humà
HSC	Cèl·lules mare hematopoètiques
HSCT	Trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques
IPA	Antígens paterns heretats
KIR	Receptor de tipus immunoglobulina de les cèl·lules assassines naturals
mHAgS	Antígens menors d'histocompatibilitat
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
MIP-1α	Proteïna inflamatòria dels macròfags 1 α

NGS	Seqüenciació de nova generació
NIMA	Antígens materns no heretats
NK	Cèl·lules assassines naturals
ONT	<i>Organización Nacional de Trasplantes</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
REDMO	Registre de Donants de Medul·la Òssia
SBT	Tipificació per seqüenciació
SCF	Factor de cèl·lules mare
SSO	Oligonucleòtids específics de seqüència
SSP	Encebadors específics de seqüència
TCR	Receptor de cèl·lules T
TNC	Cèl·lules nucleades totals
TRM	Mortalitat associada al trasplantament
UCB	Sang de cordó umbilical

INTRODUCCIÓ

1. El sistema HLA

1.1 El sistema HLA: organització i funció

En humans, el complex major d'histocompatibilitat (MHC), també anomenat **sistema d'antigen leucocitari humà (HLA)**, és un conjunt de gens localitzats al braç curt del cromosoma 6 (6p21.3). Aquests gens, molts d'ells amb funcions relacionades amb el sistema immunitari, estan agrupats en tres regions principals: MHC de classe I, MHC de classe II i MHC de classe III.¹⁻³ A la regió MHC I s'hi troben, entre d'altres, els gens que codifiquen per les molècules HLA de classe I clàssiques (**HLA-A, -B i -C**), mentre que la regió MHC II inclou els gens que expressen les molècules HLA de classe II clàssiques (**HLA-DR, -DP i -DQ**) (**Figura 1**).⁴ Pel que fa a la regió MHC III, s'hi troben gens que participen en la immunitat innata, així com d'altres que no formen part del sistema immunitari.³

Les molècules HLA de classe I i classe II clàssiques són glicoproteïnes de membrana que actuen com a **presentadores d'antigen**, ja que formen complexos amb pèptids que són presentats als **limfòcits T** (**Figura 2**). Les glicoproteïnes HLA-A, -B i -C, les quals s'expressen en gairebé totes les cèl·lules nucleades del cos, tenen la funció de presentar fragments proteïcs d'origen intracel·lular als limfòcits T CD8⁺.¹ Les molècules HLA-DR, -DQ i -DP, en canvi, es troben expressades majoritàriament a les cèl·lules presentadores d'antigen (APC), com són els limfòcits B, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (DCs), i tenen la funció de presentar fragments proteïcs d'origen extracel·lular als limfòcits T CD4⁺.^{1,5} Els pèptids que presenten les molècules HLA clàssiques poden ser propis o externs a l'organisme, ja que són els limfòcits T els responsables de reconèixer-los a través dels seus receptors de cèl·lules T (**TCR**), així com d'iniciar una resposta efectora quan és necessari. Aquestes cèl·lules tenen un paper cabdal en la resposta immunitària adaptativa, bé per a iniciar una resposta contra un patògen extern, o bé per a establir tolerància davant les estructures pròpies de l'organisme. És per aquest motiu que durant el seu desenvolupament al timus, els limfòcits T passen per uns processos de selecció positiva i negativa. D'aquesta manera, únicament aquells limfòcits que poden unir-se a les molècules HLA i que són tolerants al propi organisme, s'alliberen del timus com a cèl·lules amb capacitat d'iniciar una resposta efectora.⁴

INTRODUCCIÓ

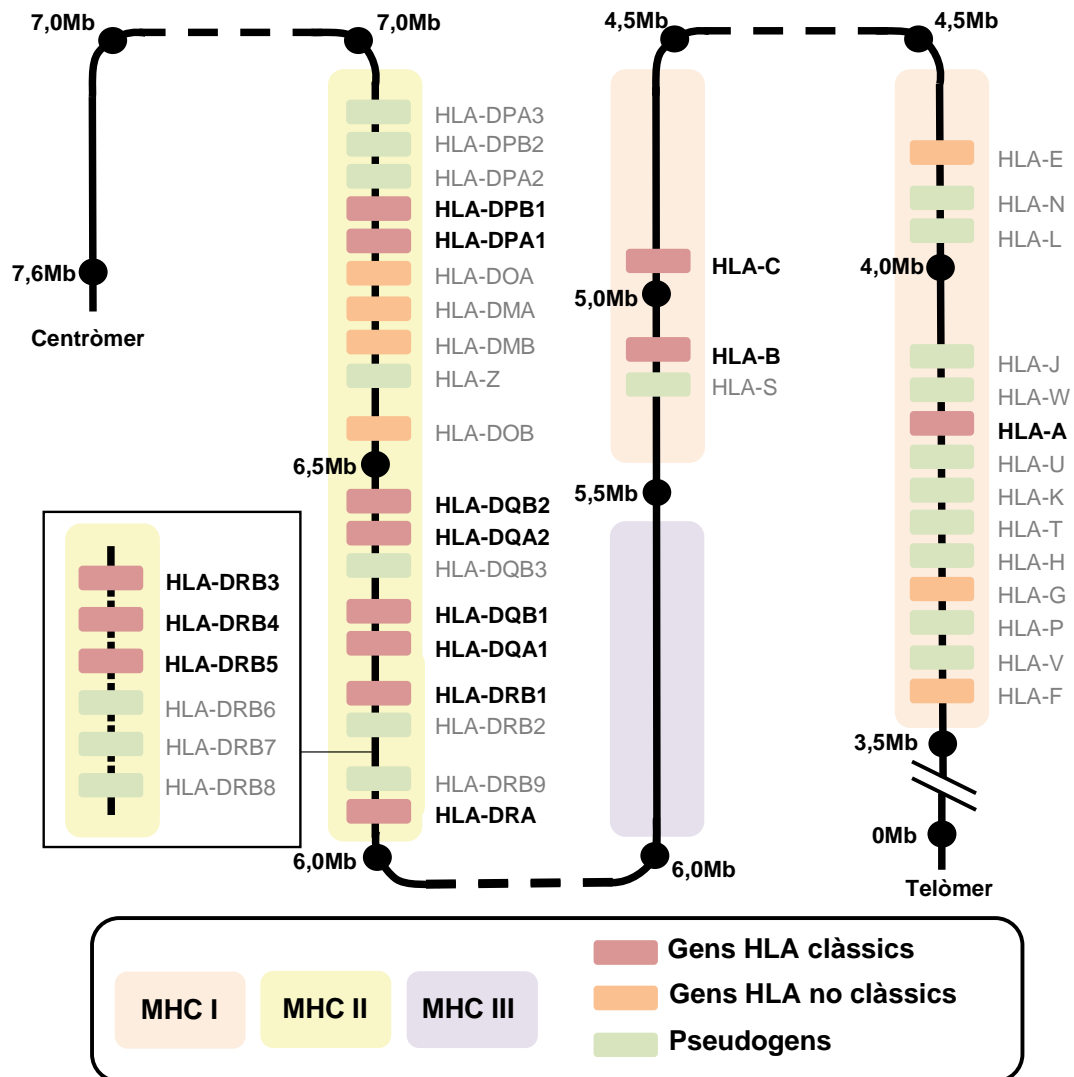


Figura 1. Mapa genètic simplificat de les regions MHC. Es mostren ombrejades les regions MHC clàssiques que es troben distribuïdes al llarg de les 7,6Mb del complex MHC. De forma simplificada, es mostren únicament els gens i pseudogens HLA. Font: adaptada de Horton *et al.*, 2004¹ i Robinson *et al.*, 2015.²

El sistema HLA presenta una sèrie de característiques que li han conferit la capacitat d'unir i presentar un immens repertori de fragments peptídics a les cèl·lules T. En primer lloc, és un sistema **poligènic**, ja que com s'ha descrit prèviament, està format per múltiples *loci* genètics que codifiquen per proteïnes que tenen una funció similar i que s'expressen a la vegada en un mateix individu. Els gens que conformen el MHC estan agrupats entre si formant clústers genètics originats, possiblement, per fenòmens de duplicació gènica.³ Els gens del sistema immunitari, inclosos els gens HLA, podrien estar sota una forta pressió evolutiva per a poder diversificar-se i fer front a l'aparició de nous epítops patològics, pel que la duplicació seguida de diversificació dels gens HLA podria

INTRODUCCIÓ

ser un dels mecanismes evolutius per aconseguir-ho.¹ L'agrupació de tots aquests gens en una mateixa regió fa que la taxa de recombinació sigui més baixa en comparació a altres zones del genoma i que s'heretin conjuntament en forma d'**haplotip**. Aquesta associació no casual d'al·lels que es troben en *loci* propers es coneix com a **desequilibri de lligament** i és un tret característic del gens HLA.^{3,4,6}

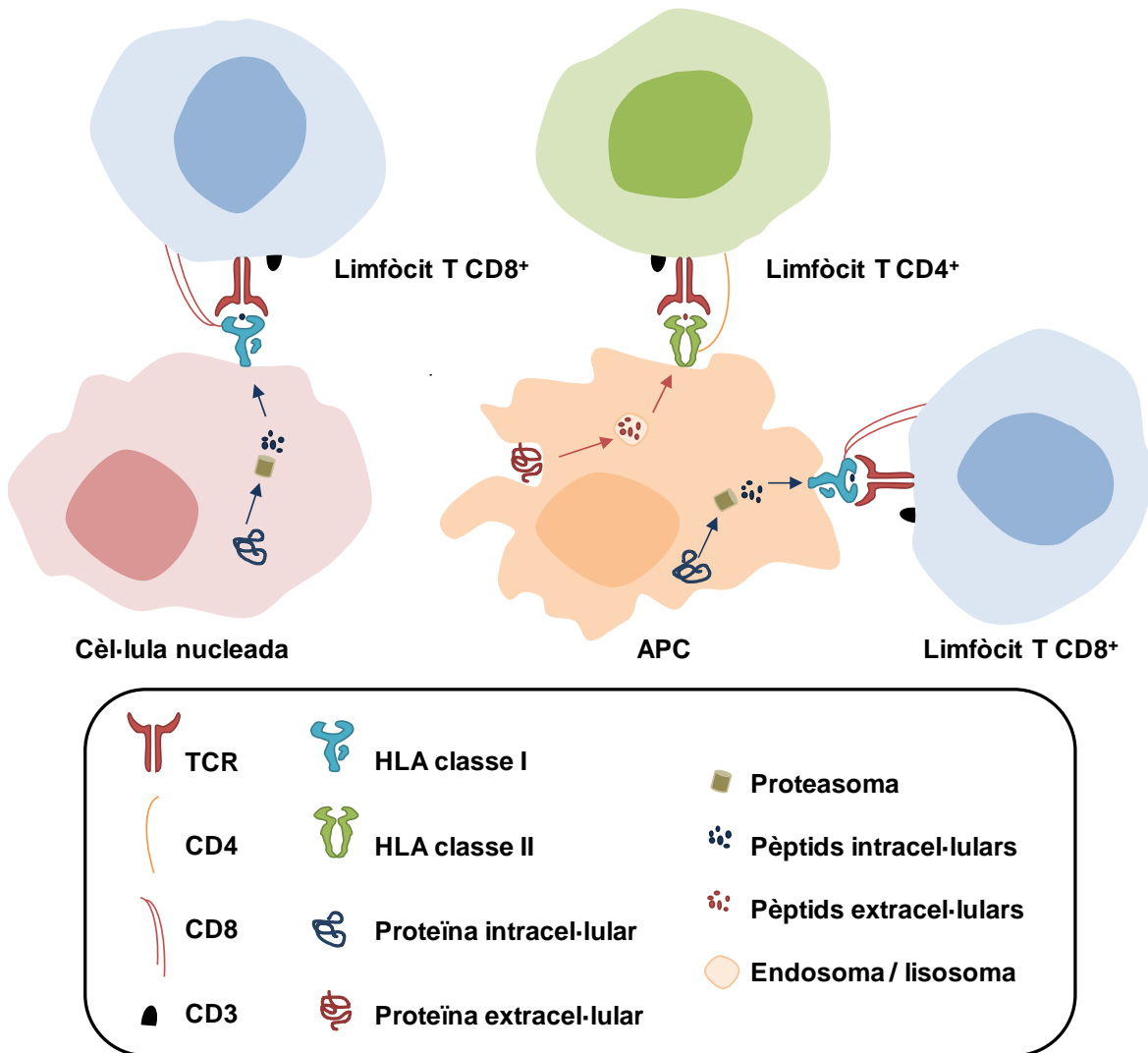


Figura 2. Presentació antigènica de les molècules HLA. De forma general, les cèl·lules nucleades presenten pèptids generats per la degradació de les proteïnes intracel·lulars al proteasoma als limfòcits T CD8⁺, a través de les molècules HLA de classe I. Les APC, a més, presenten pèptids obtinguts de proteïnes extracel·lulars degradades per via endocítica als limfòcits T CD4⁺, a través de les molècules HLA de classe II. Font: elaboració pròpia basada en Owen *et al.*, 2013.

INTRODUCCIÓ

En segon lloc, els gens que codifiquen per a aquestes molècules són altament **polimòrfics**: segons la base de dades IPD-IMGT/HLA, fins al juliol del 2019, s'han determinat 16.943 al·lels diferents de classe I clàssics i 6.658 de classe II clàssics, valors que incrementen contínuament.² Concretament, l'*HLA-B* s'ha descrit com el gen més polimòrfic del genoma humà,⁷ amb més de 6.500 al·lels diferents.² De forma majoritària, les diferències entre al·lels són polimorfismes d'un sol nucleòtid.¹ L'elevat polimorfisme, juntament amb l'expressió **codominant** d'aquests gens, fa que cada cèl·lula nucleada pugui expressar fins a 6 molècules HLA de classe I clàssiques diferents, mentre que les APCs expressen també 12 o més molècules HLA de classe II clàssiques úniques.⁴ En darrer lloc, cada una de les molècules HLA és capaç de presentar una gran varietat de fragments proteics. Això es deu al fet que els pèptids presentats per cada una d'aquestes glicoproteïnes han de compartir o presentar similitud en unes regions clau, però poden variar al llarg de la resta de la seqüència. Les variants al·lèliques expressades en cada individu determinaran aquestes estructures clau i, per tant, el **repertori** de pèptids que poden ser presentats.⁴

D'altra banda, a part de la seva implicació en la immunitat adaptativa mitjançada pels limfòcits T, les molècules HLA de classe I també estan involucrades en la resposta immunitària de les **cèl·lules assassines naturals** (NK). De forma general, el reconeixement d'aquestes glicoproteïnes pels receptors de tipus immunoglobulina de les cèl·lules NK (**KIR**) inhibidors, impedeixen l'acció citotòxica d'aquestes cèl·lules. Atès que en situacions d'estrès o de perill hi pot haver una reducció en l'expressió en superfície de les molècules HLA, aquest reconeixement és un altre dels mecanismes de control que presenta el sistema immunitari, en el qual estan implicades les molècules HLA.⁴

1.2 Estructura de les molècules HLA

La similitud funcional de les molècules HLA de classe I i classe II va associada també a una semblança estructural (**Figura 3**). Les glicoproteïnes de classe I estan formades per una cadena α pesada de 45 kDa, codificada pels gens *HLA-A*, *-B* o *-C*. Aquesta està unida de forma no covalent a una cadena lleugera de 12 kDa anomenada $\beta 2$ microglobulina, codificada per un gen fora la regió HLA (cromosoma 15). Al seu torn, la cadena α està formada per tres dominis extracel·lulars ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$), un domini transmembrana i un segment citoplasmàtic, cada un dels quals codificats per un exó o exons diferents. Així doncs, l'exó 1 codifica per un pèptid senyal que permet la inserció de la cadena al reticle endoplasmàtic i que és eliminat després de la finalització de la

INTRODUCCIÓ

traducció; els exons 2, 3 i 4 codifiquen pels dominis α_1 , α_2 i α_3 respectivament; l'exó 5 pel domini transmembrana; i la resta per la fracció citoplasmàtica. Atès que els dominis α_1 i α_2 són els que formen el **solc d'unió al pèptid (ARS)**, és a dir la regió de la molècula que està en contacte amb el fragment proteic, els exons 2 i 3 dels gens HLA de classe I són els que contenen la major part dels polimorfismes.^{3-5,8}

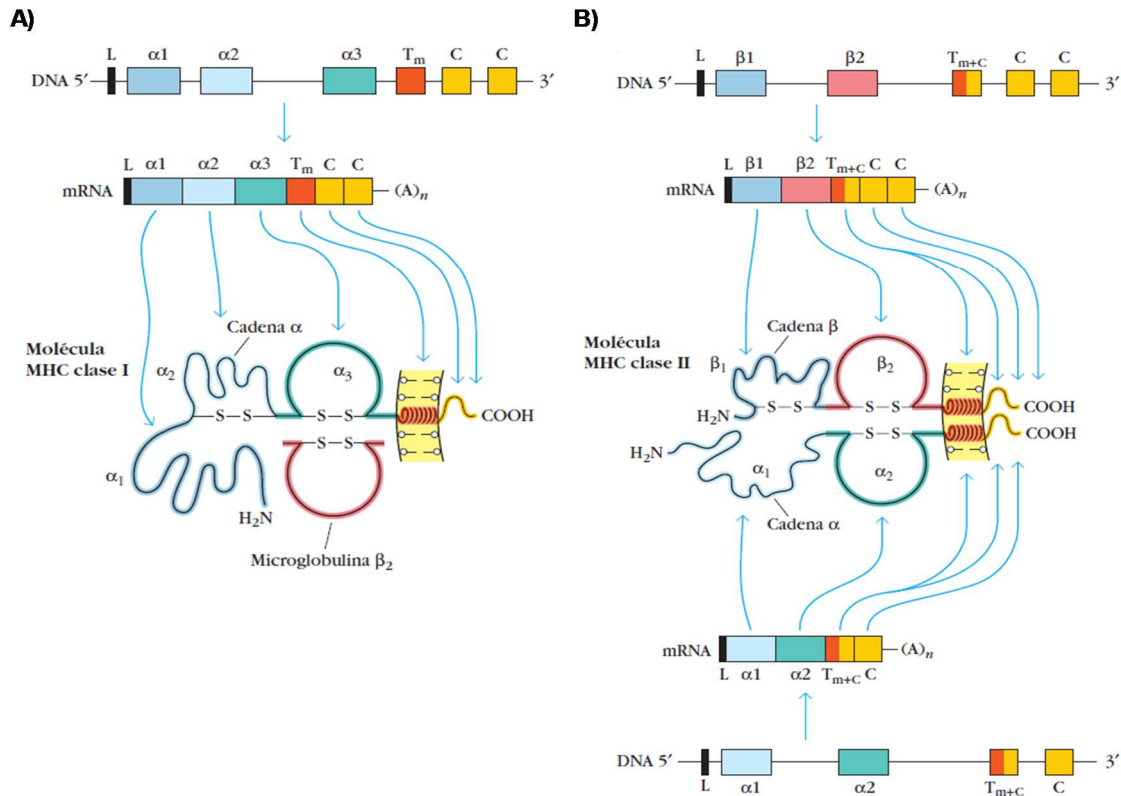


Figura 3. Relació entre els exons i els dominis proteics de les molècules HLA de classe I (A) i de classe II (B). La cadena α de les molècules de classe I clàssiques, així com les cadenes α i β de les molècules de classe II clàssiques estan codificades pels gens HLA clàssics. La cadena β_2 microglobulina de les molècules de classe I clàssiques està codificada per un gen fora de la regió MHC. Les seqüències de DNA de 5' a 3' representen els gens HLA i cada caixeta els seus respectius exons, els quals codifiquen pels diferents dominis estructurals de les glicoproteïnes. Font: obtinguda de Owen *et al.*, 2013.⁴

Pel que fa a les molècules HLA de classe II, aquestes estan formades per dues cadenes pesades associades per unions no covalents i unides totes dues a la membrana citoplasmàtica. La cadena α de 33 kDa està codificada pels gens *HLA-DRA*, *-DQA* i *-DPA*; i la cadena β de 28 kDa pels gens *HLA-DRB*, *-DQB* i *-DPB*. Aquestes estan formades per dos dominis extracel·lulars (α_1 i α_2 , i β_1 i β_2 respectivament), un domini transmembrana i una regió citoplasmàtica. De la mateixa manera que per la classe I, els

INTRODUCCIÓ

diferents dominis que conformen aquestes dues cadenes de classe II estan codificats per exons diferents. L'exó 1 també codifica per un pèptid senyal; els exons 2 i 3 dels gens de la cadena α i de la cadena β codifiquen pels dominis extracel·lulars $\alpha 1$ i $\alpha 2$, i $\beta 1$ i $\beta 2$ respectivament; l'exó 4 pel domini transmembrana; i la resta per a la fracció citoplasmàtica. Els dominis $\alpha 1$ i $\beta 1$ són els que formen l'ARS, però la major part dels polimorfismes es troben, en aquest cas, a l'exó 2 codificant de la cadena β .^{4,5,8} En algunes ocasions, existeix la presència de múltiples gens que codifiquen per les cadenes de les molècules HLA de classe II, com és el cas del HLA-DR. Hi ha quatre gens diferents (*HLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4* i *-DRB5*) que codifiquen per la cadena β d'aquesta molècula. De tots ells, el gen *HLA-DRB1* és el que presenta un major nombre de polimorfismes i, per tant, d'al·lels diferents.²

1.3 Importància clínica de les molècules HLA

Com s'ha exposat, gràcies al substancial grau de polimorfisme inherent al sistema HLA, una de les característiques primordials del sistema immunitari és la capacitat de reconèixer un ampli espectre d'epítops exògens i de distingir-los de les estructures pròpies, per poder generar, així, una resposta específica adequada davant cada situació. Tanmateix, aquest notable polimorfisme, així com la funció i organització genètica que presenten les molècules HLA, fan que aquestes glicoproteïnes estiguin associades amb diferents malalties autoimmunitàries i infeccioses, així com amb reaccions d'hipersensibilitat a fàrmacs; i que estiguin implicades en els fenòmens de rebuig durant el trasplantament d'òrgans i teixits.^{3,9-11} En aquest sentit, per exemple, l'elevat polimorfisme del sistema HLA fa que diferents individus expressin diferents variants al·lèliques d'aquests gens, les quals poden ser reconegudes com a estranyes en el context del trasplantament, generant-se una resposta intensa contra elles anomenada **al·loreconeixement**.¹² Hi ha tres tipus de mecanismes segons la forma en la qual aquests al·loantígens són reconeguts pels limfòcits T (**Figura 4**). Durant l'al·loreconeixement directe les cèl·lules T reconeixen les molècules HLA al·logèniques de forma intacta a la superfície cel·lular. En canvi, en l'al·loreconeixement indirecte, les molècules HLA al·logèniques són processades i presentades com a pèptids per molècules HLA pròpies a través d'APCs. Per aquesta via, no només les molècules HLA, sinó també pèptids al·logènics derivats d'altres gens polimòrfics, anomenats antígens menors d'histocompatibilitat (mHAGs), poden ser presentats per APCs pròpies i reconeguts pels limfòcits T.¹³ També s'ha descrit que totes dues respostes es poden generar de forma simultània, ja que les molècules HLA al·logèniques poden ser transferides entre cèl·lules del sistema immunitari, com són les APCs. En aquest cas,

INTRODUCCIÓ

les APCs pròpies podrien incorporar a la membrana molècules HLA al·logèniques intactes i presentar-les simultàniament en forma de pèptids a través de l'HLA propi, mecanisme anomenat al·loreconeixement semi-directe.¹⁴

Atès que les molècules HLA al·logèniques són capaces de causar una forta al·loreactivitat, fins i tot amb un únic canvi aminoacídic, les conseqüències d'aquesta resposta poden ser molt greus, com són la **pèrdua de l'empelt** en el trasplantament d'òrgans sòlids i la **malaltia de l'empelt contra l'hoste (GVHD)** en el **trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCT)**.^{5,12,14-16} Això explica la gran importància clínica del sistema HLA i la conseqüent necessitat de determinar les diferents variants al·lèliques que expressa un individu, procediment que s'anomena tipificació HLA.

INTRODUCCIÓ

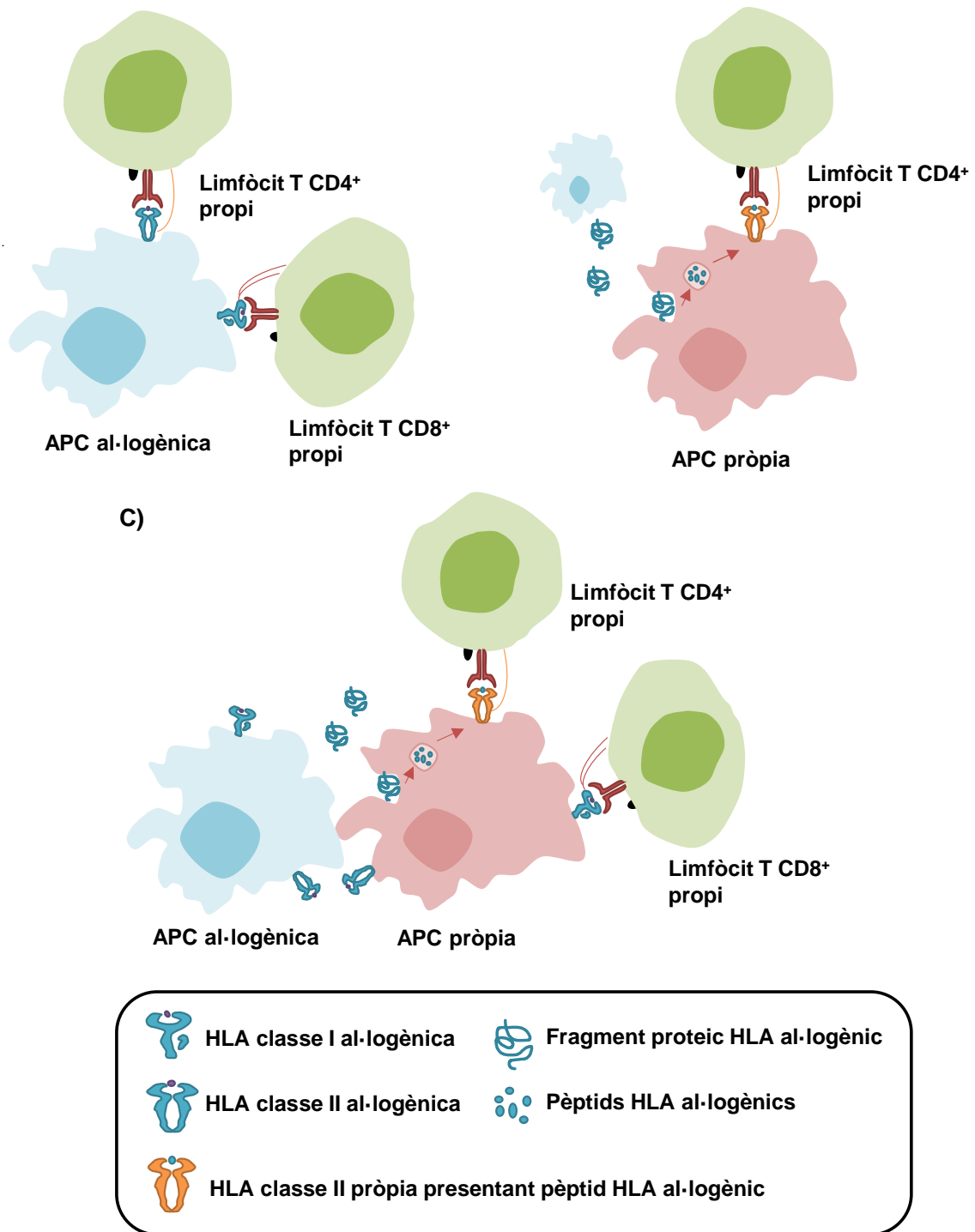


Figura 4. Tipus d'al·loreconeixement mitjançat pels limfòcits T. A) Les molècules HLA al·logèniques són reconegudes de forma intacta pels limfòcits T, quan estan exposades a la superfície de cèl·lules al·logèniques (al·loreconeixement directe). **B)** Els fragments proteics HLA al·logènics, derivats de cèl·lules al·logèniques, són processats per APC i presentats en forma de pèptids als limfòcits T a través de molècules HLA pròpies (al·loreconeixement indirecte). **C)** Tots dos mecanismes poden donar-se simultàniament quan una APC pròpia adquireix molècules HLA al·logèniques intactes (al·loreconeixement semi-directe). Font: adaptada de Afzali *et al.*, 2007.¹⁴

1.4. Tipificació HLA

1.4.1 Nomenclatura HLA

L'elevada complexitat dels gens HLA, juntament amb el gran nombre de variants al·lèliques que existeixen, fa que sigui necessària una **nomenclatura** oficial consensuada per a poder anomenar els diferents al·lells (**Figura 5**). En cas que es realitzi una tipificació HLA per biologia molecular, primer s'informa del gen que es tracta, seguit d'un asterisc i, a continuació, s'afegeixen diferents díigits numèrics separats per dos punts, els quals permeten obtenir més o menys informació de la seqüència gènica i de l'expressió d'aquell al·lel. El primer grup de díigits informa del **grup al·lèlic** al qual pertany aquella variant, que sovint coincideix amb l'antigen serològic; mentre que el segon grup de díigits informa sobre la **proteïna HLA específica**. Els al·lells que difereixen en aquests díigits varien en una o més posicions nucleotídiques que causaran un canvi d'aminoàcid. El tercer grup de díigits indica, en canvi, variacions sinònimes dins la regió codificant que no afecten la seqüència proteica, mentre que el quart grup indica canvis nucleotídics als introns o a les regions 5' i 3' no traduïdes que flanquegen els exons i els introns. A més, també es pot indicar amb diferents sufixos informació sobre l'expressió d'aquell al·lel. Quan un l'al·lel no s'expressa s'afegeix una "N" i se l'anomena al·lel nul. S'utilitza una "L" (*Low*) si la seva expressió a la superfície cel·lular és baixa; una "S" (*Secreted*) si dona lloc a una proteïna que se secreta i que no s'expressa a la membrana cel·lular; una "C" (*Cytoplasm*) si la proteïna queda retinguda al citoplasma; una "A" (*Aberrant*) si està en dubte la seva expressió; i una "Q" (*Questionable*) si el polimorfisme que presenta aquell al·lel s'ha vist que afecta el nivell d'expressió en altres al·lells.¹⁷

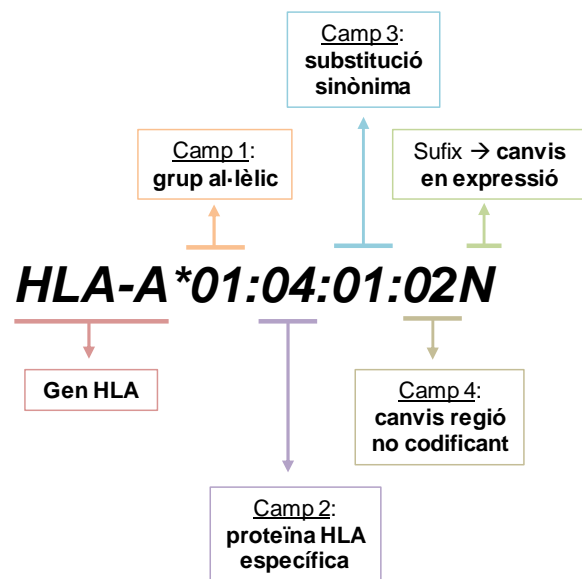


Figura 5. Nomenclatura HLA. Seguit del nom del gen, cada camp ofereix informació sobre el tipus i l'expressió de cada al·lel HLA. Font: adaptada de Robinson *et al.*, 2015.²

Es parla d'una tipificació de **baixa resolució** quan només es coneix el grup al·lèlic al qual pertany la variant analitzada. D'altra banda, quan s'identifica la seqüència proteica en l'ARS (dominis 1 i 2 de les molècules HLA de classe I; i domini 1 de classe II) i, a

INTRODUCCIÓ

més a més, es coneix si aquella variant al·lèlica s'expressa o no a la superfície cel·lular, es parla d'una tipificació d'**alta resolució**. Finalment, quan és possible definir la seqüència gènica completa descrita d'un al·lel HLA, es parla de **resolució al·lèlica**.¹⁸

Atès que la majoria de polimorfismes descrits es troben als dominis que conformen l'ARS, sovint s'ha limitat la seqüenciació dels gens HLA a aquells exons que codifiquen per aquesta regió. És per aquest motiu que han sorgit nomenclatures per agrupar aquells al·lells que en l'ARS tenen una mateixa seqüència de nucleòtids (**grups G**) o una mateixa seqüència proteica (**grups P**).²

1.4.2 Tècniques clàssiques per a la tipificació HLA

Els mètodes de tipificació HLA han evolucionat des de tècniques serològiques, basades en la determinació del fenotip HLA mitjançant l'ús d'anticossos, com ara la tècnica de la microlimfocitotoxicitat; fins a estratègies basades en l'estudi del DNA. Dins d'aquest segon grup, les tècniques que més s'han emprat durant els últims anys han estat la reacció en cadena de la polimerasa amb encebadors específics de seqüència (**PCR-SSP**), els quals són específics per un al·lel o un grup d'al·lells concrets; una tècnica basada en l'ús d'oligonucleòtids específics de seqüència (**PCR-SSO**), en què la hibridació d'una combinació de sondes determina l'antigen i el grup d'al·lells que pot expressar una seqüència concreta; la tipificació per seqüenciació (**PCR-SBT**), basada en el mètode de *Sanger*; i la **PCR a temps real**, que utilitza una combinació d'encebadors i sondes fluorescents per detectar els diferents al·lells.^{19,20}

La PCR-SBT, la qual ha permès identificar un elevat nombre de polimorfismes, ha estat considerada la tècnica de referència per a la tipificació HLA, ja que és una tècnica d'alta resolució basada en la seqüenciació dels exons més polimòrfics dels gens HLA.²¹ Tot i això, aquesta tècnica presenta certes limitacions, com són el fet que és una estratègia costosa i laboriosa per un gran nombre de mostres i que sovint presenta resultats amb ambigüitats. Les **ambigüitats** en la tipificació HLA poden ser causades pel fet de limitar la seqüenciació a unes regions concretes. En aquest cas, tots aquells polimorfismes que es troben fora de les regions seqüenciades no poden ser caracteritzats, pel que no és possible determinar l'al·lel exacte, sinó una combinació d'al·lells. D'altra banda, les tècniques clàssiques de seqüenciació basades en el mètode de *Sanger* no són capaces de diferenciar, dins les regions analitzades, aquells polimorfismes que es troben junts al mateix cromosoma (en posició *cis*) o en el cromosoma homòleg (posició *trans*). Aquest tipus d'ambigüitats, anomenades "de fase", també impedeixen determinar l'al·lel exacte.^{19,21}

1.4.3 Seqüenciació de nova generació i tipificació HLA

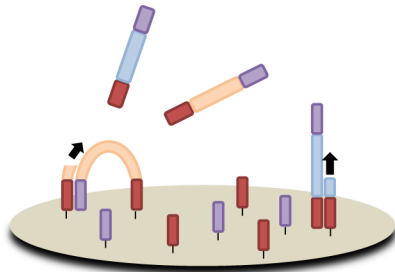
La utilització de la **seqüenciació de nova generació** (NGS) o seqüenciació massiva va iniciar-se a partir de l'any 2005, amb l'objectiu de fer front a les limitacions de cost i rendiment de la seqüenciació de l'ADN, que es van fer evidents després de la finalització del Projecte Genoma Humà l'any 2003. Des de llavors, aquestes tecnologies han anat millorant, incrementant la seva capacitat i incorporant innovacions, el que ha permès disminuir el cost de seqüenciació per megabase i incrementar el nombre i la diversitat dels genomes seqüenciats.²² La seva incorporació en diferents aplicacions clíniques i de recerca ha crescut ràpidament en els últims anys, incloent-hi l'àrea de tipificació HLA.²¹ Existeixen diferents aproximacions segons l'estratègia d'amplificació i seqüenciació emprada, les quals difereixen en la llargada dels *reads* o fragments seqüenciats, el rendiment, la taxa d'error i el cost.²² El piroseqüenciador de la companyia *454 Life Sciences* (després adquirida per Roche) va ser el primer aparell NGS en comercialitzar-se i el primer en ser emprat per la tipificació HLA. Tot i això, presentava una elevada taxa d'errors a causa de la dificultat per seqüenciar regions llargues d'homopolímers, motiu pel qual la seva producció va finalitzar-se l'any 2016. El sistema *Ion Torrent* de *Thermo Fisher Scientific*, tot i basar-se en una estratègia similar amb el de *454 Life Sciences*, ha mantingut el seu lloc en el camp de la NGS i ha estat àmpliament utilitzat per la tipificació HLA, gràcies al seu baix cost. D'altra banda, l'ampli ventall de plataformes i, per tant, d'aplicacions que ofereix **illumina**, així com la utilització d'una estratègia de seqüenciació diferents dels dos anteriors, l'han portat a dominar la indústria de la NGS i a ser una de les més utilitzades per a la tipificació HLA.²¹⁻²⁴

La tecnologia NGS es basa en una amplificació clonal dels fragments d'interès previ al procés de seqüenciació. En el cas d'Illumina (**Figura 6**), s'utilitza una estratègia basada en l'**amplificació clonal per pont** en una superfície sòlida o *flow cell*. Durant aquest pas, els fragments d'interès s'uneixen a la *flow cell* gràcies a la presència d'uns oligonucleòtids que són complementaris a les seqüències dels extrems dels fragments i, seguidament, s'amplifiquen, formant milions de **clústers** de fragments idèntics. Per a la seqüenciació, Illumina utilitza el mètode de **seqüenciació per síntesi**, en el qual nucleòtids marcats amb diferents fluorocroms i amb terminadors reversibles s'uneixen al fragment de DNA unit a la *flow cell*. Per cada cicle de seqüenciació, només s'uneix un únic nucleòtid, el que permet identificar la base de cada posició (*base calling*) gràcies a la presència del fluorocrom. Un cop acabat el cicle, el fluorocrom i el terminador reversible són eliminats per tal de procedir a la determinació de la següent base. Totes les molècules de DNA unides a la *flow cell* se seqüencien de forma massiva i paral·lela,

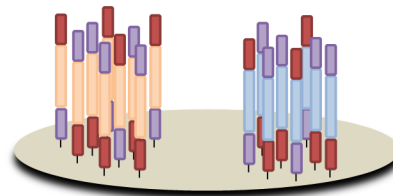
INTRODUCCIÓ

i totes aquelles que es trobin en un mateix clúster, donat que són idèntiques, emetran la mateixa senyal lumínica permetent una millor determinació de la seva seqüència.²²

A) Amplificació clonal per pont



B) Generació dels clústers



C) Seqüenciació per síntesi

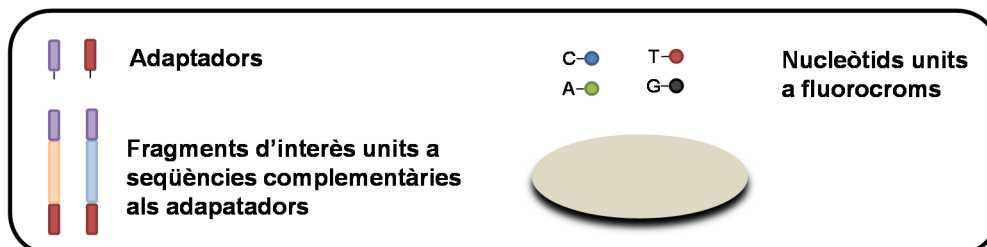
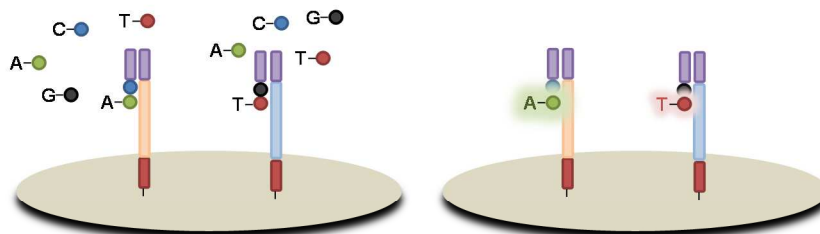


Figura 6. Estratègia de seqüenciació utilitzada per Illumina. A) Els fragments de DNA d'interès s'uneixen per complementarietat als adaptadors, el que permet la formació d'una cadena complementària nova, fixada a la *flow-cell*. Aquesta s'hibrida amb adaptadors propers, formant una estructura de pont, i s'amplifica de nou. **B)** L'amplificació d'un mateix fragment en regions properes de la *flow-cell* permet la formació dels clústers. Cada un d'ells està format per una gran quantitat de molècules en sentit *forward* i *reverse* que provenen d'un únic fragment de DNA inicial. **C)** Durant cada cicle de seqüenciació, un únic nucleòtid s'uneix per complementarietat al fragment seqüenciat i emet un senyal lumínic que permet la seva identificació. Font: adaptada de Goodwin *et al.*, 2016.²²

INTRODUCCIÓ

S'han descrit dues estratègies principals per abordar la tipificació HLA mitjançant NGS. Una d'elles es basa en l'**amplificació i seqüenciació dels exons més polimòrfics**,²⁵⁻²⁷ generalment els que codifiquen per l'ARS, mentre que l'altra es basa en la **seqüenciació dels gens complets**.^{19,23,28-30} Els avantatges que comporta la tecnologia NGS per a la tipificació HLA en comparació amb les tècniques clàssiques, així com la presència de *kits* comercials i programes d'anàlisi bioinformàtics ha comportat la seva implementació en laboratoris d'histocompatibilitat d'arreu del món. La NGS ha demostrat ser una tecnologia de molt **alt rendiment**, ja que és capaç de seqüenciar múltiples mostres de forma simultània. Això ha fet possible una **tipificació HLA en alta resolució** i de bona qualitat a un cost molt inferior al de les tècniques clàssiques. A més, ha permès **reduir el nombre d'ambigüitats**, gràcies a la possibilitat d'establir si els polimorfismes es troben en *cis* o *trans*, així com d'estendre la seqüenciació a la totalitat dels exons i a les regions intròniques.³¹

INTRODUCCIÓ

2. El polimorfisme *CCR5-Δ32*

2.1 HIV i polimorfisme *CCR5-Δ32*

El **virus de la immunodeficiència humana** (HIV) és un retrovirus, del gènere lentivirus, que infecta cèl·lules del sistema immunitari, com són els limfòcits T CD4⁺ i els macròfags. Com a conseqüència, els individus infectats desenvolupen, de forma gradual, un estat d'immunodeficiència i una major susceptibilitat a patir infeccions oportunistes i neoplàsies. Quan apareixen aquestes manifestacions clíniques, s'arriba a l'estat més avançat de la infecció o a la **síndrome de la immunodeficiència adquirida** (AIDS). L'any 2018, 37,9 milions de persones presentaven una infecció per HIV, pel que la pandèmia del HIV/AIDS continua essent un gran problema de salut pública. Tot i que encara no hi ha cap cura, la **teràpia antiretroviral** (ART) permet suprimir la replicació viral, mantenint el virus sota control i ajudant a prevenir la seva transmissió.³² Un dels principals obstacles per l'erradicació del virus és la seva capacitat de mantenir-se de forma latent en cèl·lules de vida llarga que es troben en un estat quiescent, formant el que s'anomenen **reservoris virals**.³³

S'han caracteritzat dos tipus de virus que causen la infecció: HIV-1 i HIV-2, essent el primer el que es troba distribuït de manera global i el que presenta una major capacitat de transmissió, de replicació i, en definitiva, una major virulència.³⁴ Per infectar les seves cèl·lules diana, el HIV-1 interacciona amb la molècula **CD4**,³⁵ juntament amb un coreceptor, el qual pot ser el receptor de quimiocines de tipus 5 (**CCR5**) o el receptor de quimiocines de tipus 4 (**CXCR4**) (**Figura 7**).³⁶⁻³⁸ Les soques del virus que tenen afinitat pel CCR5, s'anomenen R5 i són les que solen tenir un paper més important en la transmissió del virus i sobretot durant les primeres etapes de la infecció. En canvi, les soques X4, amb tropisme pel CXCR4, tendeixen a aparèixer en etapes més avançades de la malaltia.^{39,40}

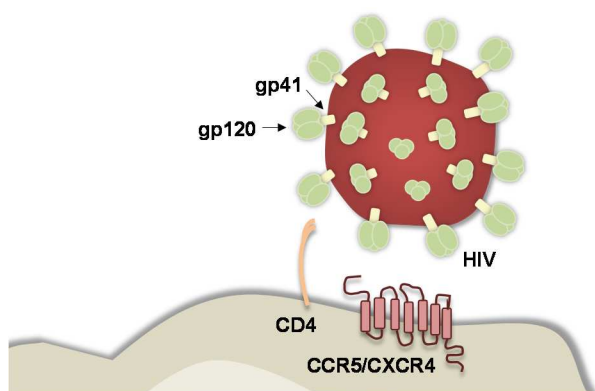


Figura 7. Molècules que intervenen en el reconeixement cel·lular del HIV. Les glicoproteïnes de l'embolcall víric (formades per les subunitats gp120 i gp41) reconeixen el receptor CD4 i un coreceptor (CCR5 o CXCR4), el que permet l'entrada del HIV a les seves cèl·lules diana. Font: elaboració pròpia.

INTRODUCCIÓ

El gen *CCR5*, localitzat al cromosoma 3 (3p21.31), codifica per un membre de la família dels receptors de quimiocines tipus β , que s'expressa en algunes cèl·lules del sistema immunitari, com els macròfags, les DCs i els limfòcits T. Entre els seus lligands es troben les quimiocines CCL3, CCL4 i CCL5, i s'ha descrit la seva implicació en l'activació, quimioatracció i reclutament de leucòcits en zones d'inflamació.⁴¹ L'any 1996 es va descobrir l'existència d'un polimorfisme en el gen *CCR5* en individus que, tot i haver estat exposats múltiples vegades al HIV, no havien estat infectats.⁴² Aquest polimorfisme, anomenat ***CCR5-Δ32***, consisteix en una deleció de 32 parells de bases que causa un canvi de pauta de lectura i la traducció d'una proteïna truncada que no s'expressa a la superfície cel·lular. Com a conseqüència, les soques del virus amb tropisme per aquest coreceptor no poden infectar les seves cèl·lules diana. Els mateixos autors van demostrar que l'expressió d'aquesta molècula era menor en els individus heterozigots per aquesta deleció, el que es corresponia amb una replicació del virus menys eficient en aquests individus. D'acord amb això, altres autors han reportat que la progressió cap al AIDS és més lenta en individus que presenten la deleció en heterozigosis.^{43,44}

Aquest polimorfisme s'ha trobat amb una freqüència més elevada en individus amb ascendència europea, essent major al nord d'Europa que a la regió mediterrània. S'ha descrit que Noruega i els països bàltics presenten una freqüència al·lèlica superior al 15%, mentre que al sud d'Europa es troba aproximadament entre el 5 i el 10%. D'altra banda, en algunes poblacions africanes, asiàtiques i sud-americanes estudiades no s'ha detectat cap individu que presenti la deleció.⁴⁵⁻⁴⁷

2.2 Implicació en el trasplantament hematopoètic

L'any 2009, es va descriure el cas d'un pacient amb leucèmia mieloide aguda i infecció per HIV que va rebre un HSCT d'un donant que presentava la deleció de 32 parells de bases del gen *CCR5* en homozigosis (*CCR5-Δ32/Δ32*). Després del trasplantament, el pacient mostrava una càrrega viral indetectable tot i deixar de rebre l'ART.^{48,49} Fins a principis del 2019, era l'únic cas en què s'havia aconseguit eliminar la infecció del HIV. Recentment, s'ha publicat el cas d'un segon pacient que, presentant també una malaltia hematològica maligna i infecció pel HIV concomitant, va rebre un trasplantament d'un donant *CCR5-Δ32/Δ32*. Tot i que es requereix un temps de seguiment major per a poder descartar un ressorgiment de la infecció, el pacient ha estat més de 18 mesos sense rebre ART i sense mostrar evidències de la infecció.⁵⁰

INTRODUCCIÓ

Tot i la baixa freqüència de la deleció i la dificultat de trobar un donant HLA compatible, s'han pogut reportar altres casos en els quals s'ha realitzat un trasplantament d'un donant homozigot per la deleció en un pacient amb HIV i una malaltia hematològica concomitant. En tots ells, però, el pacient no ha sobreviscut a causa d'infeccions, de recaiguda a la malaltia de base o del desenvolupament de GVHD.^{51,52} A més, també s'ha descrit el canvi de tropisme del virus en un d'aquests casos, essent majoritàriament R5 abans del trasplantament i esdevenint X4 després del procediment. S'ha proposat que, probablement, aquest canvi de tropisme va ser induït per la presència de cèl·lules resistents a les soques R5 després del trasplantament i als mecanismes d'escapament virals.^{53,54}

D'altra banda, s'han reportat altres casos en els quals, després de rebre un trasplantament d'un donant que no presentava la deleció i en els que la càrrega de HIV era indetectable després del procediment, la infecció viral va ressorgir setmanes després d'haver retirat l'ART. Aquest fet demostra que tot i que els pacients havien presentat una reducció considerable del reservori viral causada pel mateix trasplantament, aquest no és suficient per a la seva completa eliminació.^{55,56} S'ha proposat que el tipus de font de cèl·lules mare, el condicionament, el temps d'empelt i possiblement, una resposta del sistema immunitari de l'empelt dirigit cap al HIV (*graft-versus-HIV-reservoir*), podrien ser alguns dels mecanismes que contribueixen a l'erradicació del HIV després del HSCT a partir d'un donant al·logènic.⁵⁷

3. El trasplantament hematopoètic

3.1 Hematopoesi

L'**hematopoesi** és el procés pel qual les cèl·lules sanguínies madures i funcionals - eritròcits, plaquetes i els diferents tipus de leucòcits- es generen de forma continuada durant la vida d'un individu a partir de les **cèl·lules mare hematopoètiques** (HSC) (**Figura 8**).⁵⁸ Les HSC, identificades com a cèl·lules **CD34⁺**, tenen capacitat **multipotencial**, donat que poden diferenciar-se en els diferents tipus de cèl·lules sanguínies. Així mateix, com tota cèl·lula mare, també tenen la capacitat d'**autorenovar-se** i produir cèl·lules filles que mantinguin les seves propietats de cèl·lules mare o *stem*. A mesura que es van diferenciant, es va generant un ventall de cèl·lules progenitores cada vegada més compromeses cap a un llinatge concret i amb una capacitat de proliferació i autorenovació progressivament més limitada, fins a madurar cap a un dels tipus cel·lulars presents a la sang. Els mecanismes moleculars que regulen el balanç entre els processos d'autorenovació i diferenciació es basen en canvis en els nivells d'expressió genètica dirigits per factors de transcripció, però també per modificacions epigenètiques. Una gran part de les HSC es troben de forma quiescent en fase G₀ o presenten una freqüència de replicació molt baixa, el que probablement és un mecanisme protector per evitar l'acumulació de danys al DNA causats per l'estrès oxidatiu i pels processos de replicació cel·lular.⁵⁹

El **nínxol** o microambient que regula i manté les HSC durant la vida adulta es troba a la **medul·la òssia** (BM) (**Figura 8**). Tot i això, durant el desenvolupament prenatal, els nínxols de les HSC apareixen en diferents teixits, començant per l'aorta-gònada-mesonefre i el sac vitel·lí; seguint per la placenta i el fetge fetal; i acabant per la BM.⁶⁰ La BM és un teixit esponjós que es troba a l'interior d'alguns dels ossos del cos, com ara les crestes ilíaqües, l'estern i els ossos del crani.⁶¹ Les HSC es troben principalment de forma adjacent als capil·lars sinusoidals de la BM, on cèl·lules endotelials i cèl·lules mesenquimals estromals promouen el seu manteniment a través de la síntesi de múltiples factors, com ara el factor de cèl·lules mare (SCF) o la quimiocina CXCL12. S'ha descrit que el sistema nerviós simpàtic, l'activitat dels osteoclasts a l'endosti, així com altres tipus cel·lulars, citocines i hormones que es troben en circulació sanguínia podrien estar regulant la fisiologia i l'activitat de les HSC.⁶²

INTRODUCCIÓ

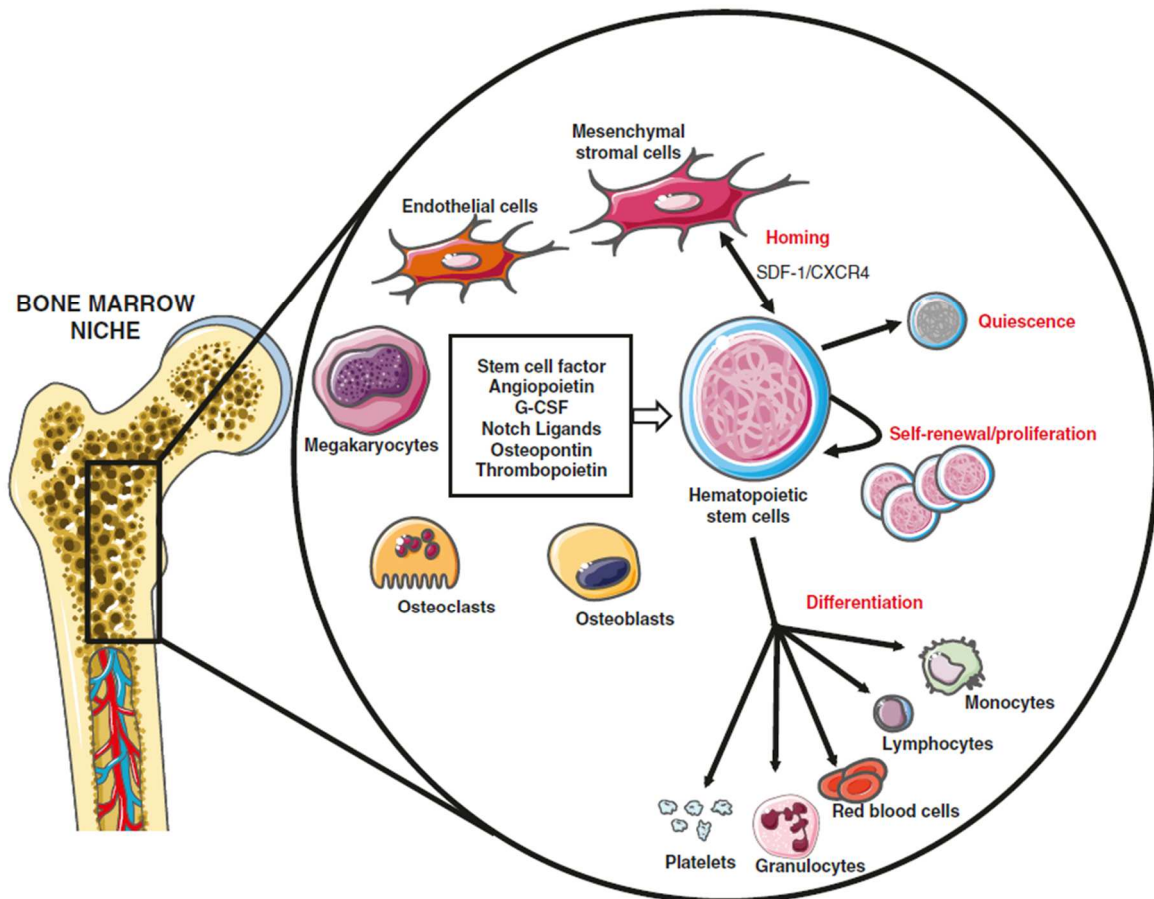


Figura 8. L'hematopoesi a la MO. El nínxol de les HSC es troba a la MO, on diferents tipus cel·lulars, com són cèl·lules mesenquimals estromals, endotelials o del teixit ossi, participen en el seu manteniment. Font: obtinguda de Aiuti *et al.*, 2019.⁵⁸

3.2 Trasplantament hematopoètic

El HSCT consisteix en la infusió de HSC sanes en pacients que presenten, generalment, una **malaltia hematològica** que causa una depleció o disfunció de la BM. El propòsit és reconstituir de nou l'hematopoesi del pacient amb cèl·lules funcionals i, en el cas de tractar-se de malalties malignes, és a dir, d'origen neoplàsic, contribuir a la destrucció de les cèl·lules tumorals. Insuficiències de la MO (aplàsia medul·lar i anèmia de Fanconi), l'absència de producció d'algunes línies cel·lulars (eritroblastopènies, neutropènies i trombocitopènies), la transformació neoplàsica d'alguna d'elles (leucèmies, gammapaties monoclonals i síndromes limfoproliferatives, mieloproliferatives i mielodisplàstiques), o la producció de cèl·lules que no funcionen correctament (immunodeficiències i malalties metabòliques) són diferents condicions que requereixen un HSCT. En funció del tipus de donant, els HSCT poden ser **autòlegs**, on el mateix pacient és el donant, o **al·logènics**, on el donant és diferent del pacient.⁶¹

Els coneixements sobre histocompatibilitat i el desenvolupament de fàrmacs amb capacitat mieloablative i immunosupressora, van permetre realitzar el primer HSCT al·logènic amb èxit l'any 1968.⁶³ A causa de l'elevat polimorfisme dels gens HLA, la compatibilitat en aquests gens entre el donant i el receptor és un factor crucial en el HSCT. Històricament, s'ha considerat que un **germà HLA-idèntic** és el millor donant per un HSCT al·logènic. Tot i això, atès que, aproximadament, només el 35% dels pacients tenen germans HLA-idèntics, la necessitat de trobar un donant compatible ha promogut la creació dels **registres nacionals de donants voluntaris**.⁶⁴ L'any 1974, l'organització Anthony Nolan va iniciar-se a Londres com al primer registre de donants i, cap a finals dels anys 80 i principis dels 90, se'n van establir molts més arreu del món.⁶⁵ Actualment, més de 35 milions de donants voluntaris es troben disponibles als registres internacionals i l'any 2018, més de 20.000 pacients d'arreu del món va rebre un HSCT a partir d'un donant no emparentat.⁶⁶ La probabilitat de trobar un donant compatible varia en funció de l'origen ètnic del receptor, essent major per pacients de procedència europea. En canvi, a causa de la diversitat genètica HLA de les poblacions africanes i asiàtiques en comparació amb l'europea i la seva menor representació en els registres internacionals, la probabilitat de trobar un donant per un receptor amb aquesta procedència és considerablement menor.⁶⁷

Tot i que la **BM** ha estat la font tradicional de HSC, cap a finals dels anys 80 es va demostrar que les HSC podien mobilitzar-se a la sang perifèrica gràcies a l'acció del factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF). Aquestes cèl·lules poden ser

INTRODUCCIÓ

extretes a través d'un procediment anomenat afèresi. En conseqüència, a partir dels anys 90, el seu ús va anar augmentant considerablement, de manera que, l'any 2018, gairebé un 70% dels HSCT es van realitzar amb **sang perifèrica mobilitzada**. Així mateix, els estudis que demostraven la presència de HSC a la **sang de cordó umbilical** (UCB) van permetre començar a utilitzar també aquesta font de progenitors cap a finals dels anys 80. Actualment, més de 780.000 unitats de UCB es troben disponibles als registres internacionals i l'any 2018, al voltant del 12% dels HSCT realitzats es van fer amb aquest tipus de font de HSC.^{64,66}

Quan un pacient requereix un HSCT al·logènic i no presenta un germà HLA-idèntic, s'inicia la cerca en els registres nacionals i internacionals per trobar un donant compatible no emparentat, o bé una unitat de UCB.⁶⁸ També, existeix una altra modalitat de trasplantament, anomenada **trasplantament haploidèntic**, en la que el donant només comparteix un haplotip HLA amb el receptor.¹³ En tots els casos, la infusió de les HSC es realitza un cop el pacient ha rebut el **condicionament**, un règim preparatori basat en quimioteràpia i sovint també en radioteràpia. L'objectiu del condicionament és erradicar les cèl·lules canceroses en cas de tractar-se d'una malaltia maligna, immunodeprimir el pacient per tal d'assegurar l'empelt i prevenir el rebuig i el GVHD, i permetre que les noves HSC infoses puguin ocupar el nínxol hematopoètic a la BM del receptor.⁶⁹ Després del trasplantament, el pacient es troba immunodeprimit, pel que les infeccions bacterianes, fúngiques o virals són freqüents i cal controlar-les. Així mateix, altres complicacions importants com són la pèrdua de l'empelt, neoplàsies secundàries o el GVHD tenen un fort impacte en la progressió del pacient posttrasplantament.

Encara que la compatibilitat en els gens HLA és la que presenta el major impacte en els resultats del HSCT, altres gens polimòrfics també han demostrat tenir-hi un paper important, com són els mHAGs i els receptors KIR.¹³ També s'ha descrit que l'edat del donant; la presència d'anticossos en el pacient reactius amb les molècules HLA del donant (anticossos anti-HLA); i la presència d'anticossos específics de citomegalovirus en el donant i receptor tenen també un impacte important en els resultats del trasplantament.⁷⁰⁻⁷² D'altra banda, la compatibilitat en el grup sanguini sembla tenir un efecte més moderat, mentre que hi ha controvèrsies pel que fa a l'impacte atribuïble al sexe.⁶⁸

3.3 Efectes de l'empelt sobre l'hoste: GVHD i GVL

La complicació que posa més en risc la vida després del HSCT és el GVHD. Al voltant del 30-50% dels pacients desenvolupen la forma aguda d'aquesta malaltia (**aGVHD**), la qual és la major causa de mortalitat a curt termini després del HSCT al·logènic. El desenvolupament de la malaltia s'inicia amb el dany tissular que es genera després del règim de condicionament. Això provoca l'alliberament de citocines inflamatòries, l'augment en l'expressió de les molècules HLA, l'activació de les APC a causa del reconeixement de patrons moleculars associats a perill, i la conseqüent activació i proliferació dels limfòcits T al·loreactius. Seguidament, s'inicia la fase efectora de la malaltia, el que comporta danys tissulars a causa de l'activitat cel·lular citotòxica i l'alliberament de citocines proinflamatòries, essent la pell, el fetge i el tracte gastrointestinal les regions més afectades. El dany tissular indueix l'alliberació de senyals inflamatoris, el que perpetua i augmenta el progrés de la malaltia. D'acord amb la severitat de les afectacions, la malaltia es classifica en quatre graus (I-IV). La incompatibilitat HLA és el factor de risc més important pel desenvolupament d'aquesta resposta al·loimmunitària.^{73,74}

D'altra banda, la forma crònica d'aquesta malaltia (**cGVHD**) és la major causa de morbiditat i mortalitat no associada a recaiguda que es produeix a llarg termini després del trasplantament. De forma general, s'inicia entre el tercer mes i el segon any després del HSCT i la seva incidència és, aproximadament, del 50%, tot i que és menor en nens.⁷⁵ En aquest cas, hi ha una alteració de la tolerància immunitària i, tant la immunitat innata com l'adquirida, es veuen afectades.⁷⁶ Les manifestacions clíniques solen ser similars a les que apareixen en la majoria de les malalties autoimmunitàries, i diferents òrgans i teixits es veuen afectats, com ara la pell, els ulls, la mucosa oral, el fetge, el tracte gastrointestinal, els genitals, els pulmons i les articulacions. Entre d'altres, la incompatibilitat HLA entre el donant i el receptor, i el fet d'haver desenvolupat aGVHD són factors de risc importants.⁷⁵ Tot i això, el desenvolupament de cGVHD s'ha associat amb un risc menor de recaiguda en el cas de les malalties hematològiques malignes.⁷⁷

D'altra banda, certa al·loreactivitat després del trasplantament és favorable en les malalties hematològiques malignes, ja que contribueix a l'eliminació de cèl·lules tumorals residuals que han sobreviscut als tractaments de quimioteràpia i radioteràpia durant el condicionament.⁶¹ Aquest efecte es coneix amb el nom d'**empelt contra la leucèmia** (GVL), i hi participen limfòcits T i cèl·lules assassines naturals (NK) al·loreactives derivades del donant. Els antígens diana de les cèl·lules T al·loreactives

INTRODUCCIÓ

són el sistema HLA, els mHAgS i altres antígens més específics de les cèl·lules tumorals.⁷⁸

Atès que els tractaments per evitar o eliminar el GVHD actuen sobre les cèl·lules T al·loreactives, també causen un increment del risc de recaiguda o ressorgiment de la neoplàsia. És per aquest motiu que determinar els mecanismes immunològics que difereixen entre els dos efectes és clau per aconseguir reduir el GVHD sense comprometre l'efecte GVL. En aquest sentit, en els últims anys s'han investigat diferents estratègies en l'àmbit preclínic, com ara la utilització de citocines, la depleció selectiva de cèl·lules T al·loreactives, l'ús de cèl·lules immunitàries amb capacitat reguladora i agents farmacològics. Tot i que hi ha evidències que l'efecte GVL podria separar-se del GVHD, encara són necessaris estudis prospectius per avaluar la seva eficàcia clínica.⁷⁹

4. La sang de cordó umbilical pel trasplantament hematopoètic

4.1 El cordó umbilical

El **cordó umbilical** es forma a partir del mateix zigot durant el desenvolupament prenatal i té la funció d'unir el fetus amb la placenta. En un nounat, la seva mida mitjana es troba al voltant dels 50-70 centímetres de llargada i 2 centímetres de diàmetre, i té una forma helicoidal. Està format per una vena umbilical, que transporta nutrients i sang rica en oxigen des de la placenta fins al fetus; i dues artèries umbilicals, les quals retornen la sang desoxigenada i sense nutrients cap a la placenta (**Figura 9**). Totes elles estan immerses en la gelatina de Wharton, constituïda per teixit connectiu i cèl·lules mesenquimials.⁸⁰

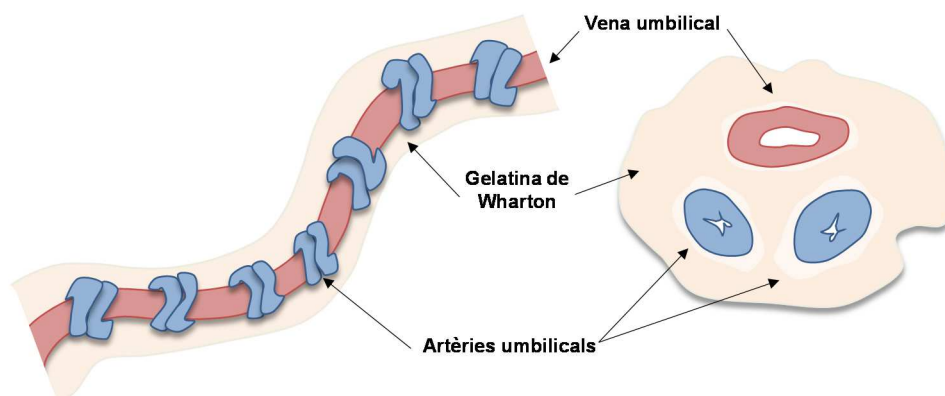


Figura 9. El cordó umbilical. Font: elaboració pròpia.

4.2 Des del primer trasplantament a la creació dels bancs de cordó

Durant els anys 70 i 80, es va descobrir que existia una proporció major de **HSC a la sang fetal i a la UCB** en comparació a la sang perifèrica adulta,⁸¹⁻⁸³ les quals s'ha reportat que disminueixen al voltant d'un 30-40% a les 24 hores després del naixement.⁸⁴ La presència d'aquestes cèl·lules multipotencials i amb capacitat d'autorenovació va motivar estudiar la possibilitat d'utilitzar la UCB com a font de cèl·lules mare pel HSCT. A finals dels anys 80, Broxmeyer i col·laboradors van analitzar el contingut de cel·lular de més de 100 unitats de UCB i van demostrar que la quantitat de cèl·lules nucleades i progenitors hematopoètics que contenia la UCB estava dins del rang que es considerava necessari per aconseguir un empelt amb èxit després d'un trasplantament de BM.⁸⁵ A més, també van reportar que una gran quantitat d'aquestes cèl·lules podien ser recuperades de forma funcionalment viable després de sotmetre-les a processos de criopreservació i descongelació. Aquests resultats van permetre proposar la UCB com a font de HSC pel trasplantament.

L'any 1989, Gluckman i col·laboradors van publicar el **primer trasplantament de UCB**, realitzat en un nen amb anèmia de Fanconi.⁸⁶ La donant de cordó va ser la seva germana, nascuda uns mesos abans del trasplantament. Els testos genètics corresponents, realitzats abans del naixement de la nena, van confirmar la seva compatibilitat HLA amb el pacient, van descartar una afectació per la malaltia i van permetre procedir a la criopreservació de la unitat de cordó. Després del trasplantament, el pacient va tenir una bona recuperació hematopoiètica i les complicacions posttrasplantament van ser lleus. L'èxit d'aquest trasplantament va obrir la porta a la utilització d'unitats de UCB procedents de germans HLA compatibles en pacients pediàtrics amb anèmia de Fanconi,^{87,88} així com amb altres afectacions hematològiques malignes i no malignes.⁸⁹⁻⁹³

Tot i que les cèl·lules de UCB tenien un empelt més lent en comparació amb les de BM,^{86,88,90,92} aquests primers trasplantaments van demostrar que la UCB era una font suficient de HSC amb un risc molt baix de GVHD.⁹⁴ Així mateix, els estudis *in vitro* també reportaven que la UCB, tot i presentar una menor quantitat de cèl·lules CD34⁺, contenia una major proporció de cèl·lules CD34⁺ en un estat de diferenciació menys avançat i amb una capacitat d'expansió més gran.⁹⁵ Tot això va portar a plantejar la possibilitat d'utilitzar la UCB com a font de HSC en pacients adults i en receptors no emparentats i amb cert grau d'incompatibilitat HLA amb el donant. Com a conseqüència, els primers programes pilots per la creació de **bancs de UCB** va iniciar-se cap a principis dels anys

INTRODUCCIÓ

90 als Estats Units i a Europa.⁹⁶⁻¹⁰¹ Concretament, l'any 1992, el Dr. Pablo Rubinstein va fundar el primer banc de cordó públic del món al *New York Blood Center*. Posteriorment, el seu grup publicava unes condicions de processament de les unitats de UCB, basades en la concentració dels progenitors hematopoètics abans de la criopreservació i en el rentat de les unitats després de ser descongelades.¹⁰² El banc de sang de cordó umbilical de Barcelona també va ser un dels primers a fundar-se, l'any 1995. Un any més tard, es realitzava el primer trasplantament de UCB no emparentat a Espanya, utilitzant una unitat criopreservada al banc. Va ser el primer banc públic espanyol i actualment, és un dels bancs de cordó més actius d'Europa i del món.

El fet de poder tenir les unitats criopreservades i tipificades per HLA, disponibles per al seu ús al·logènic, plantejava certs avantatges en relació a la donació adulta, com ara una disminució del temps d'espera pel trasplantament. A més, era una font de HSC que prèviament es descartava i que, per tant, la seva recollida no comportava cap risc pel donant. Finalment, la menor freqüència d'agents infecciosos en el nou-nat també es considerava un avantatge de la UCB respecte la BM adulta.⁹⁷

L'any 1995 es va fundar **Eurocord** per la professora Eliane Gluckman, amb l'objectiu de ser un registre internacional del trasplantament de cordó i coordinar la recerca enfocada a la millora dels seus resultats. Actualment, Eurocord manté una col·laboració propera amb els bancs de cordó d'arreu del món i treballa per analitzar els resultats del trasplantament de cordó, desenvolupar estàndards i recomanacions sobre els criteris per a la selecció de les unitats de cordó, i reportar evidències que suportin l'ús de la UCB pel trasplantament.¹⁰³

L'establiment de bancs de cordó en diferents països va fer de gran importància disposar de mètodes estandarditzats per la col·lecció, criopreservació i descongelació dels cordons, així com per la quantificació de les HSCs. Amb aquesta finalitat, l'any 1998 es va fundar la *International NetCord Foundation*, una associació de bancs de cordó umbilical que va publicar l'any 2000, juntament amb la *Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT)*, els primers **estàndards internacionals** per als bancs de cordó umbilical. Aproximadament cada tres anys es publiquen noves edicions d'aquests estàndards, els quals són reconeguts universalment pels programes de trasplantament de cordó.^{103,104}

Els bons resultats obtinguts en els primers trasplantaments de cordó en pacients no emparentats¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ van promoure que la utilització de la UCB anés creixent de manera

global, convertir-se en una alternativa a la BM adulta i a la sang perifèrica mobilitzada. Actualment, la UCB és una font ben establerta pel HSCT en pacients amb malalties hematològiques malignes i no malignes. Més de 780.000 unitats de UCB es troben criopreservades als bancs públics d'arreu del món, i al voltant de 35.000 pacients han pogut rebre un trasplantament de UCB.⁶⁶

4.3 Recollida i processament de la sang de cordó umbilical

La recollida de la UCB es realitza després del naixement del nadó, un cop la mare ha donat el seu consentiment, essent una **donació altruista** i completament voluntària. El cordó umbilical es pinça, es desinfecta i es realitza una punció de la vena umbilical, deixant caure la sang per gravetat dins una bossa de recollida. Aquest procés es pot dur a terme quan la placenta encara és dins de l'úter (*in utero*) o després que hagi estat expulsada (*ex utero*).¹⁰⁸

En la majoria de bancs de cordó, només aquelles unitats que disposin d'un mínim de cèl·lules seran seleccionades per al seu processament. La **reducció de volum** de les unitats, per tal d'eliminar el plasma i les hematies i concentrar la fracció de cèl·lules nucleades, es considera un procediment necessari per aconseguir un producte de qualitat i per garantir la cost-efectivitat dels bancs de cordó. El procés de **criopreservació** es realitza en congeladors amb programes de congelació controlats i utilitzant substàncies crioprotectors per tal de minimitzar el dany cel·lular. Les unitats es mantenen en tancs de nitrogen líquid, a una temperatura al voltant dels -196 °C, fins al moment de ser seleccionades per al trasplantament. Per tal de garantir que el producte que es criopreserva és segur, la UCB s'analitza per comprovar l'absència de **malalties infeccioses** i potencialment transmissibles a través de la sang, com són les infeccions causades pel HIV-1, HIV-2, el virus de l'hepatitis B i C, el virus limfotròfic humà de cèl·lules T (tipus I i II), així com la sífilis. A més, s'han implementat tests per descartar malalties emergents com el Chagas i també s'analitza l'estat immunològic front al Toxoplasma, al virus Esptein Barr i citomegalovirus, a causa de la seva implicació en el trasplantament. També es té en compte l'historial mèdic de la mare per descartar possibles **malalties genètiques**. Donada la incidència, relativament elevada, d'anomalies de l'hemoglobina, aquesta s'analitza per analitzar la seva conformació. D'altra banda, per garantir la **qualitat de la unitat de cordó**, s'analitzen les seves característiques cel·lulars, especialment el contingut de cèl·lules CD34⁺, així com el potencial de creixement i la viabilitat de les HSC mitjançant citometria de flux i anàlisi

INTRODUCCIÓ

del potencial clonogènic (o assaig d'unitats formadores de colònies). Tota aquesta informació, juntament amb la tipificació HLA i la determinació del grup sanguini i Rh, es reporta als registres de donants voluntaris nacionals i internacionals. Tot i això, quan una unitat de cordó se selecciona per al trasplantament cal que es confirmi la seva tipificació HLA. Així mateix, és recomanable realitzar la tipificació de la mare del donant de cordó per comprovar que les dues mostres comparteixen un haplotip HLA, el que s'utilitza com a mètode de control de la identitat de la unitat de UCB.¹⁰⁸

4.4 Característiques de les cèl·lules de la sang de cordó umbilical

La possibilitat d'utilitzar la UCB com a font de cèl·lules mare pel HSCT, va impulsar la realització d'estudis per caracteritzar fenotípicament i funcionalment les diferents poblacions cel·lulars que s'hi troben i que són, finalment, les responsables de l'èxit del trasplantament.

Una de les característiques principals que presenta la UCB és la **immaduresa de les HSC**. A diferència de la BM adulta o la sang perifèrica mobilitzada, la proporció de cèl·lules progenitores amb un fenotip més primitiu o indiferenciat (cèl·lules CD34⁺CD38⁻), és major a la UCB.^{95,109} Les HSC de cordó han demostrat tenir una gran capacitat de generar colònies de progenitors multipotencials,^{82,110} alhora que formen colònies més grans *in vitro*, el que constitueix una mesura del nombre de divisions que poden realitzar aquestes cèl·lules abans d'entrar en un procés de maduració final.⁹⁵ Així mateix, produeixen una major proporció de colònies formades per progenitors més indiferenciats i tenen una capacitat d'autorenovació també més gran del que presenten les cèl·lules de BM.¹¹¹⁻¹¹³ Aquestes característiques, descrites ja entre els anys 80 i 90, recolzaven un gran potencial d'expansió de la UCB a llarg termini i van permetre consolidar la confiança en el seu ús per al trasplantament al·logènic no emparentat, tant en pacients pediàtrics com en pacients adults.

Així com les HSC, altres tipus cel·lulars ja diferenciats que circulen per la UCB també presenten un fenotip més immadur en comparació amb els que es troben en la circulació adulta. Pel que fa als **limfòcits T**, diferents estudis han demostrat que presenten diferències fenotípiques i funcionals, el que es podria explicar per la seva poca experiència durant l'embaràs per a respondre enfront d'antígens externs. D'entrada, la UCB conté una major proporció de cèl·lules T que expressen CD45RA⁺,¹¹⁴ la isoforma que expressen els limfòcits T naïf, és a dir, aquells limfòcits T madurs que encara no han reconegut el seu antígen específic. D'altra banda, la sang perifèrica adulta té una

INTRODUCCIÓ

freqüència més elevada de cèl·lules que expressen CD45RO⁺,¹¹⁵ la qual està associada a l'adquisició de memòria immunològica. Així mateix, s'ha descrit que els limfòcits T de la UCB exhibeixen fenotips més característics dels estadis finals de la diferenciació intratímica.^{116,117} Funcionalment, tot i que s'ha reportat que després d'una estimulació al·logènica, les cèl·lules T de cordó presenten una resposta proliferativa similar a la que presenten les cèl·lules T adultes, la seva capacitat citotòxica és, en canvi, menor.¹¹⁸⁻¹²⁰ Aquest fet també podria ser causat per un menor nombre de cèl·lules T citotòxiques a la UCB.¹¹⁵ Pel que fa a les **cèl·lules T reguladores CD4⁺ CD25⁺**, s'ha descrit que es troben amb una freqüència major a la UCB que a la sang perifèrica adulta i que, tot i tenir un fenotip majoritàriament naïf, presenten una potent capacitat de suprimir la resposta efectora al·logènica.¹²¹⁻¹²³

De la mateixa manera que els limfòcits T, les **DCs**^{124,125} derivades de UCB també han demostrat ser més immadures. Atès que aquestes són APC que tenen un paper clau en la inducció de la resposta immunològica de les cèl·lules T, aquest estat immunològic més immadur afecta la seva capacitat d'estimular-les.¹²⁶ S'ha vist que presenten una menor secreció d'algunes citocines proinflamàtores, així com una menor expressió de molècules de superfície importants per a la presentació antigènica i l'activació de limfòcits T, com són l'HLA de classe II i molècules coestimuladores.¹²⁷⁻¹²⁹ Així mateix, s'han reportat també diferències fenotípiques i funcionals entre les **NK** de la UCB i la sang perifèrica adulta.¹³⁰ Aquestes cèl·lules tenen un paper important en la resposta immunològica contra cèl·lules tumorals o infectades per agents virals. Tot i que s'ha reportat una menor acció citotòxica de les cèl·lules NK que deriven de UCB, s'ha vist que la seva capacitat lítica es veu fàcilment potenciada en resposta a citocines.^{131,132} A més, també s'ha descrit una major proporció de cèl·lules NK a la UCB en comparació amb la sang perifèrica adulta.^{115,133}

En conjunt, la UCB presenta unes HSC i unes **cèl·lules immunitàries més immadures**, amb característiques pròpies d'un sistema immunitari fetal. Però no només la biologia de les cèl·lules que circulen a la UCB fan que aquesta tingui unes propietats diferents, sinó que la UCB com a font de cèl·lules mare presenta una limitació important respecte les altres fonts de HSC: el **contingut total de cèl·lules nucleades i cèl·lules CD34⁺** que es poden obtenir en cada unitat de UCB és **considerablement menor**. Tot i que la freqüència de HSC que circulen a la sang fetal, així com a la UCB, és similar a la que es troba a la BM adulta i significativament major que la que es troba a la sang perifèrica adulta en condicions normals, de mitjana, les unitats de UCB presenten només un 10%

INTRODUCCIÓ

del nombre de HSC trobats en una extracció de BM i només un 5% si es compara amb la sang perifèrica mobilitzada.^{134–136}

4.5 Peculiaritats del trasplantament de sang de cordó umbilical

Totes aquestes característiques han fet que, d'una banda, la UCB sigui una font molt valuosa pel trasplantament però, de l'altra, han limitat també el seu ús i han fet que es mantingui com a una opció alternativa. Com ja es va anar fent evident després dels primers trasplantaments, hi ha dos aspectes que han caracteritzat l'evolució posttrasplantament de la UCB en relació amb les fonts adultes: un **empelt hematopoètic i una recuperació immunitària més lenta**; i una **menor incidència i gravetat de GVHD**.

4.5.1 Empelt hematopoètic i recuperació immunitària

L'**empelt hematopoètic** fa referència a la capacitat de les HSC del donant a repoblar la BM i reconstituir de nou les cèl·lules sanguínies i el sistema immunitari del pacient. Una recuperació immunitària potent després del HSCT és essencial per limitar el risc d'infeccions i de recaiguda.¹³⁷ Les cèl·lules del sistema immunitari innat, com ara els neutròfils, els monòcits i les cèl·lules NK, són les que solen recuperar-se durant les primeres setmanes després del trasplantament. En canvi, les de la immunitat adaptativa (limfòcits B i T) poden trigar mesos, inclús anys, a recuperar-se completament.¹³⁸

La **recuperació de neutròfils i de plaquetes** després del trasplantament de UCB són un indicatiu del temps que triguen les HSC a empeltar a la BM. En general, després del trasplantament de UCB, el temps de recuperació de neutròfils és major en comparació amb el de les altres fonts adultes, el que es podria explicar per un menor nombre de cèl·lules CD34⁺ a la UCB, ja que la seva quantitat s'ha correlacionat amb el temps de recuperació de neutròfils.^{139,140} De forma general, la recuperació dels limfòcits B i cèl·lules NK a partir de les HSC que es troben a l'empelt sembla ser més ràpida en el trasplantament de UCB. En canvi, tot i que hi ha cert grau de controvèrsia en relació a les dades que reporten la recuperació de cèl·lules T, en la majoria dels casos s'observa una reconstitució T més lenta en aquest tipus de trasplantament.¹⁴¹

Just després del trasplantament es produeix una **primera onada de reconstitució de cèl·lules T**, la qual és independent del timus. Les cèl·lules T del donant que es troben a l'empelt, o bé les del receptor que han sobreviscut al condicionament, s'activen i s'expandeixen, ja sigui de forma homeostàtica a causa de l'estat de limfopènia o en resposta a l'estimulació antigènica.^{137,141} Aquesta via és important per controlar les

INTRODUCCIÓ

reactivacions virals, majoritàriament de citomegalovirus i del virus Epstein Barr, així com d'altres agents infecciosos oportunistes. Tot i que les cèl·lules T de la UCB són capaces d'activar-se i expandir-se, la menor quantitat d'aquest tipus cel·lular a l'empelt, així com el seu estat més naïf i la menor proporció de cèl·lules T de memòria, podrien estar limitant aquesta resposta.¹⁴² Així mateix, s'ha descrit que la utilització de la globulina antitímocítica (ATG) en el trasplantament de UCB, com a mètode de depleció de les cèl·lules T per evitar una resposta al·loreactiva, té un fort impacte negatiu en aquesta primera onada de recuperació T.¹⁴³

Els **nous limfòcits T** que es generen a partir dels precursors hematopoètics de l'empelt, que maduren al timus i que presenten un repertori **TCR divers i funcionalment competent**, participen en la segona fase de reconstitució T.¹³⁷ Hi ha dos factors que juguen un paper important en aquest procés després del trasplantament de UCB. Un d'ells és el menor nombre de progenitors hematopoètics, els quals causen un endarreriment en empelt i en la generació de precursors tímics. En segon lloc, s'ha reportat que el major grau d'incompatibilitat HLA que hi sol haver entre el donant i el receptor en el trasplantament de UCB, podria afectar de manera negativa la selecció de cèl·lules T dins el timus i alterar la diversitat del repertori de TCR.^{137,144} Tot i això, l'edat del pacient, la presència de GVHD, el tipus de condicionament i l'ús d'ATG també influencien en la rapidesa de la reconstitució T després del trasplantament de UCB.^{137,141,142,145} No es coneix amb certesa si la reconstitució més lenta de les cèl·lules T observada després del trasplantament de UCB és causada per les pròpies característiques de la UCB o bé per factors aliens, com el tipus de condicionament o de profilaxi.¹⁴² D'altra banda, s'ha observat que tot i la menor quantitat de cèl·lules infoses, la diversitat de TCR a llarg termini després del trasplantament de UCB és major que l'obtinguda amb BM,¹⁴⁶ el que podria ser explicat per un potencial superior dels progenitors hematopoètics de la UCB.¹³⁷

En conjunt, la menor quantitat de cèl·lules nucleades i cèl·lules CD34⁺ presents a la UCB està associat a un endarreriment en la recuperació immunitària i a un risc major de **perdre l'empelt**.¹³⁴ A més, una recuperació immunitària més lenta després del trasplantament de UCB augmenta el risc de patir **infeccions i reactivacions virals**, especialment durant els primers 3 mesos posttrasplantament.¹⁴² Tot això ha fet que en algunes ocasions s'hagi limitat l'ús de la UCB a pacients pediàtrics o de baix pes.

INTRODUCCIÓ

4.5.2 Estratègies per millorar l'empelt hematopoètic i la recuperació immunitària

S'han desenvolupat diferents estratègies amb l'objectiu de millorar l'empelt de les HSC i la recuperació immunitària després del trasplantament de UCB, les quals es basen en **(1) augmentar les HSC infoses o la seva capacitat d'empelt, (2) minimitzar la depleció de limfòcits T, i (3) l'ús de la immunoteràpia** per controlar les reactivacions virals, la recaiguda o el GVHD.

Mètodes per augmentar les HSC infoses

Per tal d'augmentar el nombre de HSC infoses, s'ha proposat **expandir ex vivo les cèl·lules CD34⁺** abans d'infondre-les, utilitzar un trasplantament de UCB doble (**dCBT**), és a dir, dues unitats parcialment compatibles, o infondre simultàniament una unitat de cordó juntament amb cèl·lules CD34⁺ seleccionades d'un donant haploideàtic o **Haplo-Cord**. Pel que fa a l'expansió *ex vivo* de cèl·lules CD34⁺, diferents aproximacions com les basades en l'ús d'activadors de la senyalització Notch, de nicotinamida o del lligand *Stem regenin-1* han permès augmentar la quantitat de cèl·lules CD34⁺ *in vitro* a la vegada que les mantenen en un estat indiferenciat. També, s'han desenvolupat estratègies d'expansió utilitzant cèl·lules mare mesenquimals, les quals simulen el nínxol hematopoètic mitjançant la producció de citocines que promouen la proliferació de les HSC. L'ús d'aquests mètodes en assaigs clínics ha permès augmentar considerablement el nombre de HSC infoses i ha demostrat una major rapidesa en la recuperació de neutròfils.^{147,148}

Els dCBT es van començar a utilitzar amb la finalitat de fer front a la limitació que suposava per als pacients adults el baix nombre de cèl·lules.^{149,150} Hi ha certa controvèrsia quant als beneficis que presenten els dCBT en comparació als mètodes que utilitzen només una unitat. En general, els resultats de trasplantament són similars entre les dues modalitats, excepte pel major risc de GVHD i el menor risc de recaiguda que s'associa als dCBT.¹⁵¹ La utilització del dCBT ha permès, però, que el trasplantament de UCB sigui una opció per a aquells pacients adults que no disposen d'una unitat amb els requeriments cel·lulars establerts i, a més, han estat utilitzats en els assaigs d'expansió cel·lular *ex vivo*. Actualment es recomana la seva utilització en el cas de malalties hematològiques malignes si no es disposa d'una unitat de UCB amb la dosi cel·lular mínima establerta.¹⁰⁸

En darrer lloc, en els Haplo-Cords, les cèl·lules CD34⁺ seleccionades d'un donant haploideàtic permeten un empelt ràpid que, en la majoria dels casos, és substituït de

forma gradual per l'empelt de les cèl·lules progenitores de la unitat de cordó. Aquest tipus de procediment ha demostrat una major rapidesa en la recuperació hematopoètica i uns bons resultats de trasplantament. Tot i això, s'ha detectat un risc de recaiguda elevat en aquells pacients en els quals el cordó no ha acabat empeltant.¹⁵²⁻¹⁵⁶

Mètodes per augmentar la capacitat d'empelt de les HSC

Una altra estratègia proposada per augmentar la capacitat d'empelt de les HSC és facilitar la seva arribada a la BM o *homing*. L'anàleg de la prostaglandina E2 s'ha utilitzat per a aquest propòsit, ja que estimula el creixement i el *homing* de les HSC, a través d'induir l'expressió d'una proteïna inhibidora de l'apoptosi i del receptor de quimiocines CXCR4. Una altra opció ha estat la fucosilació dels lligands de selectines que es troben a les HSC, d'acord amb la seva participació en les interaccions amb les cèl·lules de l'endoteli vascular durant el *homing*. En darrer lloc, també s'ha investigat l'acció del sitaglipin, un inhibidor de l'enzim que trunca el factor derivat de cèl·lules estromals (també anomenada CXCL12). Aquesta última és una quimiocina produïda per cèl·lules estromals, la qual té una implicació important en el *homing* de les HSC. Les tres estratègies, utilitzades en assaigs clínics, han demostrat reduir el temps de recuperació dels neutròfils.^{148,157} D'altra banda, l'administració intraòssia del contingut de la unitat de cordó durant el trasplantament ha demostrat ser una pràctica segura que disminueix el risc de GVHD agut i que, en alguns casos, també demostra una millora en la capacitat d'empelt.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Mètodes per minimitzar la depleció dels limfòcits T

L'ATG, utilitzada com a profilaxi de la malaltia GVHD, és un preparat d'anticossos policlonals obtinguts generalment en ratolí, després de la seva immunització amb timòcits o línies de cèl·lules T. Tot i això, la diana d'antígens pels quals tenen especificitat aquests anticossos és molt àmplia i l'acció d'aquest fàrmac no recau únicament en la depleció de cèl·lules T, sinó que també interfereix en la funció d'altres tipus cel·lulars del sistema immunitari i en la timopoiesi.^{162,163}

La utilització d'aquest fàrmac en el trasplantament de UCB permet reduir el risc de rebuig i de GVHD, però té un impacte negatiu en la reconstitució immunitària posttrasplantament i, en conseqüència, augmenta la incidència d'infeccions virals oportunistes i de recaigudes.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Tot i que aquest efecte s'ha observat també en el trasplantament hematopoètic de HSC adultes, l'impacte en el trasplantament de UCB és més sever.¹⁶⁷ A més, en certes condicions clíniques s'ha reportat que si s'omet l'ús

INTRODUCCIÓ

d'ATG en el trasplantament de UCB, s'aconsegueix una recuperació de cèl·lules T ràpida, les quals són capaces de fer front a les reactivacions virals del pacient. En aquests casos el risc de GVHD agut ha estat major però manejable, mentre que el risc de GVHD crònic s'ha mantingut baix.^{143,166} D'acord amb això, s'ha proposat ometre l'ús d'ATG o adaptar la seva dosi i el moment d'aplicació per a cada pacient, en funció de diferents factors com ara el pes, l'edat, la malaltia d'origen i el seu estat immunològic.^{164,166,168}

Immunoteràpia contra reactivacions virals, recaiguda i GVHD

A causa del baix nombre de cèl·lules que presenten les unitats de UCB i la no disponibilitat dels donants per poder administrar infusions de cèl·lules T després del trasplantament, diferents grups han investigat la possibilitat d'expandir *ex vivo* les cèl·lules T del cordó amb la finalitat de prevenir les infeccions o tractar la recaiguda després del trasplantament de UCB.¹⁵⁷ Tot i el seu estat més naïf i la seva menor citotoxicitat, s'ha reportat la capacitat d'expandir limfòcits T amb diferents especificats virals.^{169,170} També s'han desenvolupat cèl·lules T amb receptors d'antígens quimèrics que, a banda de tenir especificitat viral, també tenen especificitat tumoral.¹⁷¹ En darrer lloc, altres grups han expandit cèl·lules T reguladores derivades de UCB amb l'objectiu de disminuir la severitat de GVHD agut i com a tractament del GVHD crònic.^{170,172} Tot i que prometedores, totes aquestes estratègies són actualment laborioses i requereixen un temps de processament llarg, el que augmenta els costos del trasplantament de cordó.¹⁵⁷

4.5.3 Incidència i severitat de GHVD

El trasplantament de UCB està associat a una **menor probabilitat de desenvolupar GVHD** en comparació amb el trasplantament de les fonts adultes.^{134,173} Atès que la incompatibilitat HLA és el principal factor associat al desenvolupament d'aquesta malaltia, el menor risc de GVHD després del trasplantament de UCB s'atribueix, de forma general, a una **major tolerància a les discrepàncies HLA** entre donant i receptor.¹⁷⁴

Aquest fet podria estar relacionat amb la immaduresa dels limfòcits T i de les DCs.¹⁷⁴ Pel que fa a les cèl·lules T, s'ha vist que tenen una expressió reduïda dels factors de transcripció que indueixen la seva diferenciació cap a fenotips associats amb el desenvolupament d'aquesta malaltia.¹⁷⁵ S'ha descrit també que després de ser estimulades a través del TCR, les cèl·lules T de cordó secreten fàcilment IL-10, una

citocina antiinflamatòria que redueix la severitat del GVHD i que promou la tolerància vers l'empelt. Així mateix, es creu que les cèl·lules immunitàries amb capacitat reguladora que es troben a la UCB, com les cèl·lules T reguladores i les cèl·lules mare mesenquimals, podrien estar contribuint al menor risc de GVHD.¹⁷⁴

La major tolerància a la incompatibilitat HLA confereix a la UCB no només la possibilitat de disminuir la morbiditat i mortalitat associada al GVHD, sinó que també incrementa la possibilitat de localitzar una unitat adequada, fins i tot per receptors amb un origen ètnic menys representat als registres de donants.⁶⁷ A més, aquest menor risc de GVHD no està associat a un menor efecte GVL després del trasplantament de UCB.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

4.6 Criteris per a la selecció de les unitats pel trasplantament

4.6.1 Dosi cel·lular i compatibilitat HLA

Ja en els primers trasplantaments de UCB es va demostrar la importància del nombre de cèl·lules infoses i de la compatibilitat HLA en els resultats posttrasplantament,^{105,106} així com d'altres estudis posteriors van reportar la interacció entre aquestes dues variables.^{179,180} Un major nombre de cèl·lules nucleades totals (TNC) a la unitat de cordó s'ha associat amb un empelt més ràpid i amb una major supervivència.¹⁸¹ A la **Figura 10** es reporta el mínim de **TNC** i de **cèl·lules CD34+** per quilogram del pacient que ha de tenir una unitat de UCB per tal de ser seleccionada per al trasplantament, segons el grau de compatibilitat HLA, del tipus de malaltia o de si es tracta d'un dCBT.¹⁰⁸

Pel que fa a l'**HLA**, una major compatibilitat entre la unitat de cordó i el receptor s'ha associat amb un empelt més ràpid i a una menor incidència i severitat de aGVHD. Alguns estudis també reporten una menor mortalitat associada al trasplantament (TRM) i una supervivència més elevada amb una major compatibilitat HLA, mentre que hi ha discrepàncies en relació al risc de recaiguda. Tot i que l'HLA és important en el trasplantament de UCB, les incompatibilitats es toleren millor en aquest tipus de trasplantament en comparació amb els que es realitzen amb fonts adultes.¹⁷³ És per això, que el grau de compatibilitat que s'utilitza en els criteris de selecció de les unitats de UCB pel trasplantament és menor. En el cas dels donants adults, es requereix que donant i receptor comparteixin els al·lels dels gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* (10/10); acceptant-se únicament una discrepància (9/10).¹⁸² A més, hi ha evidències que recolzen la importància de la compatibilitat en el gen *HLA-DPB1*.¹⁸³ Històricament i d'acord amb els resultats dels primers trasplantaments, en el cas de la UCB, s'han tingut

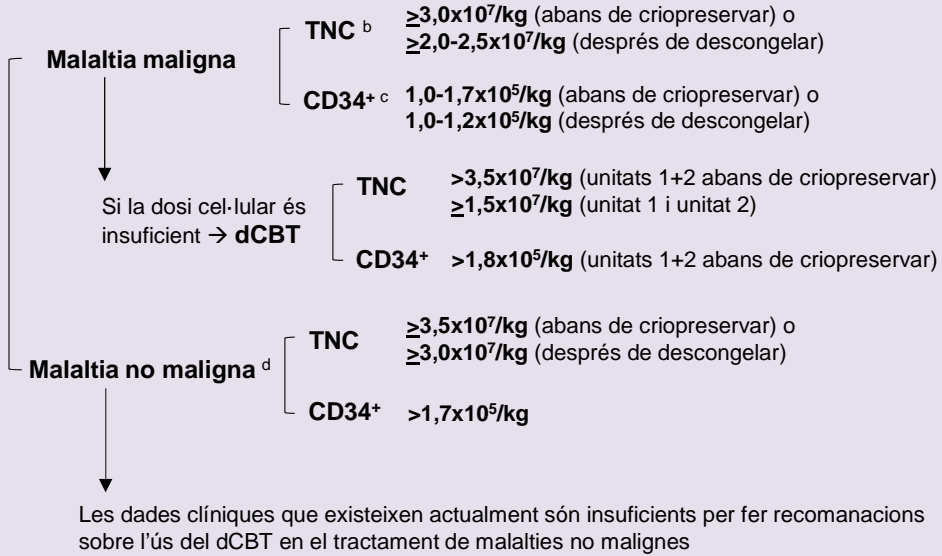
INTRODUCCIÓ

en compte els gens **HLA-A** i **-B** en baixa resolució i el gen **HLA-DRB1** en alta resolució (6/6), acceptant-se fins a dues diferències (4/6 o 5/6).¹⁸¹

Tot i això, estudis posteriors han analitzat l'impacte en la consideració d'uns criteris de compatibilitat HLA més estrictes entre la unitat de cordó i el receptor.¹⁸⁴ L'any 2011 es va reportar que tenir en compte també el gen **HLA-C** estava associat a un menor risc de TRM després del trasplantament de UCB, pel que es va recomanar considerar la compatibilitat d'aquest gen en baixa resolució.¹⁸⁵ Posteriorment, diferents estudis van reportar l'efecte de la compatibilitat a nivell al·lèlic i en **alta resolució** en els gens **HLA-A, -B, -C** i **-DRB1**. Alguns autors van demostrar que tenir en compte aquest nivell de compatibilitat no suposava cap benefici en el trasplantament de UCB. Sanz i col·laboradors van realitzar un estudi retrospectiu en 79 pacients adults amb leucèmia mieloide aguda i no van trobar que la incompatibilitat HLA estigués associada amb la TRM, el GVHD o amb l'empelt. En canvi, van veure que un major grau de disparitat a nivell d'al·lel estava associat a un menor risc de recaiguda i a una major supervivència lliure de malaltia.¹⁸⁶ De forma similar, Brunstein i col·laboradors van reportar un estudi realitzat en 342 pacients, majoritàriament adults, que havien rebut un dCBT a causa d'una malaltia hematològica maligna, i en el que, a més, van incloure també l'anàlisi del gen **HLA-DQB1**. En aquest cas, tampoc no van trobar que un major grau d'incompatibilitat HLA en alta resolució estigués associat a un major risc de TRM, de GVHD o de pèrdua de l'empelt; mentre que sí que van observar un risc menor de recaiguda en un subgrup de pacients amb leucèmia aguda.¹⁸⁷

D'altra banda, altres estudis sí que han reportat un impacte negatiu de la incompatibilitat HLA en alta resolució en els resultats del trasplantament de UCB. En un estudi realitzat a partir de la col·laboració de la professora M. Eapen amb el *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR), Eurocord, Netcord, i la *European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT), es va analitzar de forma retrospectiva l'impacte de l'alta resolució en els gens **HLA-A, -B, -C** i **-DRB1** en 1.568 pacients.¹⁸⁸ La cohort analitzada estava formada principalment per pacients pediàtrics i adolescents, i també incloïa individus adults que havien rebut el HSCT a causa d'una leucèmia aguda o una síndrome mielodisplàsica. Independentment de l'edat i la dosi de cèl·lules infoses, es va reportar que una millor compatibilitat HLA en alta resolució estava associada a una menor TRM. També es va demostrar un major risc de pèrdua de

Dosi cel·lular ^a



Compatibilitat HLA

Trasplantament UCB simple (gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1* en alta resolució)

Malaltia maligna

- 1) Compatibilitat **8/8**; TNC >3,0x10⁷/kg
 - 2) Compatibilitat **7/8**; TNC >5,0x10⁷/kg
 - 3) Compatibilitat **6/8** o **5/8**; TNC >5,0x10⁷/kg
 - 4) En cas de no haver-hi cap més opció disponible: compatibilitat **4/8**; TNC >5,0x10⁷/kg
- No es recomana compatibilitat ≤3/8
 - Incompatibilitats en *HLA-A* i *HLA-B* són preferibles que en *HLA-DRB1*

Malaltia no maligna

- 1) Compatibilitat **8/8** o **7/8**
 - 2) Compatibilitat **6/8** o **5/8**
- No es recomana compatibilitat ≤4/8

dCBT Compatibilitat ≥4/6 (*HLA-A* i *-B* en baixa resolució, *HLA-DRB1* en alta resolució)

No hi ha requeriments respecte a la compatibilitat entre les dues unitats de UCB

Ab anti-HLA → evitar utilitzar unitats amb antígens HLA específics per anticossos HLA del pacient

INTRODUCCIÓ

Altres consideracions

- Utilitzar **bancs de cordó acreditats**, reconeguts per organitzacions nacionals i internacionals.
- **Compatibilitat ABO**. Podria estar associada amb millors resultats, però les dades són conflictives en els trasplantaments amb una unitat. En el cas dels dCBT es recomana tenir-la en compte.
- **NIMA**. En presència de tipificació HLA materna, el seu efecte s'ha d'analitzar en el context d'assaigs clínics.
- **Lligands KIR**. No s'ha d'utilitzar a causa de dades conflictives.
- **Sexe**. No és necessari.

^a Assaig d'unitats formadores de colònies: aquest assaig és important per avaluar la capacitat funcional de les HSC després de descongelar. Tot i això, és difícil establir una dosi de CFU-GM a causa de les variacions en el comptatge entre centres.

^b Si la dosi de TNC infosa es troba entre 1,0-2,0x10⁷/kg, el nombre de cèl·lules CD34⁺ o de CFU-GM s'ha de tenir en compte per predir la probabilitat de la recuperació de neutròfils i per discutir la possibilitat d'un segon trasplantament. Si la seva dosi és inferior a la recomanada, s'ha de realitzar un espirat de BM i un anàlisi de quimerisme entre els dies +20 i +28. L'absència d'empeltament indica la necessitat d'un segon trasplantament.

^c A causa de variacions en el comptatge de les cèl·lules CD34⁺, cal tenir precaució amb aquesta recomanació. Tot i això, si les colònies no estan creixent, s'ha de considerar un segon trasplantament després del dia +30.

^d Per pacients amb insuficiència de la medul·la òssia o hemoglobinopaties, el nombre de TNC abans de congelar ha de ser >5x10⁷.

Figura 10. Criteris per a la selecció de la UCB pel trasplantament. Font: adaptada de Querol *et al.*, 2019.¹⁰⁸ Aquests criteris s'han descrit d'acord amb Hough *et al.*, 2016,¹⁸⁹ Eapen *et al.*, 2014¹⁸⁸ i Eapen *et al.*, 2017.¹⁹⁰

l'empelt amb més incompatibilitats HLA i que seleccionar unitats amb una dosi cel·lular major a la requerida no contribuïa a reduir la TRM. Amb tot això, els autors recomanaven seleccionar unitats amb un mínim de TNC per assegurar l'empelt i després prioritzar aquelles unitats amb un major grau de compatibilitat en alta resolució i tenint en compte el gen HLA-C. Posteriorment, un segon estudi de la mateixa autora va demostrar la importància de la compatibilitat en alta resolució d'aquests gens HLA en el trasplantament de UCB per malalties hematològiques no malignes. En aquest estudi, que incloïa 1,199 pacients pediàtrics, es va reportar que una millor compatibilitat en alta resolució en els gens *HLA-A, -B, -C* i *-DRB1* estava associat a una major supervivència, a causa d'un menor risc de pèrdua de l'empelt.¹⁹⁰ Derivat dels resultats d'aquests dos grans estudis, actualment es recomana utilitzar pel trasplantament de UCB una unitat que tingui una **compatibilitat $\geq 5/8$** , tenint en compte els gens ***HLA-A, -B, -C* i *-DRB1*** en alta resolució. En el cas dels dCBT, se segueix recomanant la utilització dels criteris

INTRODUCCIÓ

convencionals de compatibilitat HLA ($\geq 4/6$, tenint en compte *HLA-A* i *-B* en baixa resolució i el *HLA-DRB1* en alta resolució) (**Figura 10**).¹⁰⁸

Altres grups també han confirmat l'efecte de l'alta resolució després del trasplantament de UCB en cohorts més petites. Oran i col·laboradors van realitzar un estudi retrospectiu amb 133 pacients, majoritàriament adults, que havien rebut un dCBT a causa d'una malaltia hematològica maligna. En aquest cas, van demostrar que una compatibilitat en alta resolució entre la unitat dominant i el pacient estava associada a una menor TRM, sobretot en aquells pacients majors de 32 anys.¹⁹¹ De forma similar, el grup de Mallhi, va estudiar l'impacte de l'alta resolució en 106 pacients majoritàriament pediàtrics amb desordres metabòlics heretats que van rebre un trasplantament de UCB. Considerant el grup de trasplantament que havia presentat una compatibilitat 6/6 segons els criteris convencionals, aquells que tenien una compatibilitat també en alta resolució presentaven una major supervivència, un menor risc de pèrdua de l'empelt i una menor TRM.¹⁹²

Atès que la presència d'alguna incompatibilitat HLA sol ser freqüent en el trasplantament de UCB, un altre factor que hi té un efecte important és la presència d'**anticossos** en el receptor dirigits **contra les molècules HLA** del donant de cordó. S'ha vist que la presència d'aquests anticossos té un impacte negatiu en el temps d'empelt de la unitat de cordó i, en alguns casos, també en el risc de recaiguda i de mortalitat.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Ésser aquest motiu que és necessari identificar-los abans del trasplantament.¹⁰⁸

4.6.2 HLA matern: determinació dels NIMAs

Un altre aspecte que s'ha proposat tenir en compte en la selecció de les unitats de UCB pel trasplantament és la tipificació HLA de la mare del donant de cordó. Aquesta proposta es basa en la tolerància que desenvolupa el sistema immunitari fetal durant l'embaràs cap a les molècules HLA maternes no heretades, anomenades antígens maternos no heretats (**NIMA**) (**Figura 11a**).^{196,197} L'exposició als NIMA induïx la generació de cèl·lules T reguladores que suprimeixen la resposta immunitària fetal contra aquests al·loantígens maternos, les quals sembla que poden persistir durant la vida adulta.¹⁹⁸ Diferents autors han reportat evidències d'aquesta resposta tolerogènica en el context del trasplantament d'òrgans sòlids i en el HSCT. En el cas del trasplantament de ronyó, s'ha reportat una supervivència major de l'òrgan quan el receptor i el germà donant difereixen en l'haplotip matern en lloc del patern.¹⁹⁹ De forma

INTRODUCCIÓ

similar, s'ha descrit que en els trasplantaments haploidèntics el risc de aGVHD és menor quan el receptor i el donant germà no comparteixen l'haplotip matern però sí el patern.^{200,201}

Pel que fa al trasplantament de UCB, s'ha reportat en dos estudis retrospectius l'impacte de l'exposició fetal durant l'embaràs a les molècules HLA-A, -B i -DRB1 maternes. Aquests estudis van analitzar comparativament els resultats dels trasplantaments de UCB amb compatibilitat NIMA (considerats aquells en els que el receptor presenta un al·lel o antigen HLA que no és compartit per la unitat de cordó, però sí que el presenta la mare del donant de cordó) amb els trasplantaments sense compatibilitat NIMA (aquells en els que el receptor presenta un al·lel o antigen HLA que no és compartit ni per la unitat de UCB ni per la mare del donant de cordó) (**Figura 11b**). Van Rood i col·laboradors van observar que els trasplantaments amb compatibilitat NIMA presentaven un menor risc de TRM, de mortalitat global i de pèrdua de l'empelt, així com un empelt de neutròfils més ràpid, especialment en aquells trasplantaments amb pitjor pronòstic.²⁰² De forma similar, el grup de Rocha va presentar que els trasplantaments amb compatibilitat NIMA presentaven un menor risc de TRM i una supervivència global major.²⁰³

Altres autors han analitzat l'impacte que tindria utilitzar els NIMA en la probabilitat de trobar una unitat de UCB compatible pel trasplantament. Substituint els al·lells o antígens HLA de la unitat de cordó pels respectius maternes, aquests estudis demostren que el nombre de possibles fenotips (anomenats "**fenotips virtuals**") augmenta de forma considerable. Com a conseqüència, aquest fet permet augmentar la probabilitat de trobar una unitat compatible per a un receptor que necessiti un trasplantament, a la vegada que incrementa la cost-efectivitat dels bancs de cordó umbilical.²⁰⁴⁻²⁰⁶

En referència a totes aquestes evidències, es recomana estudiar l'efecte del NIMA després del trasplantament de UCB en el context d'assaigs clínics (**Figura 10**).

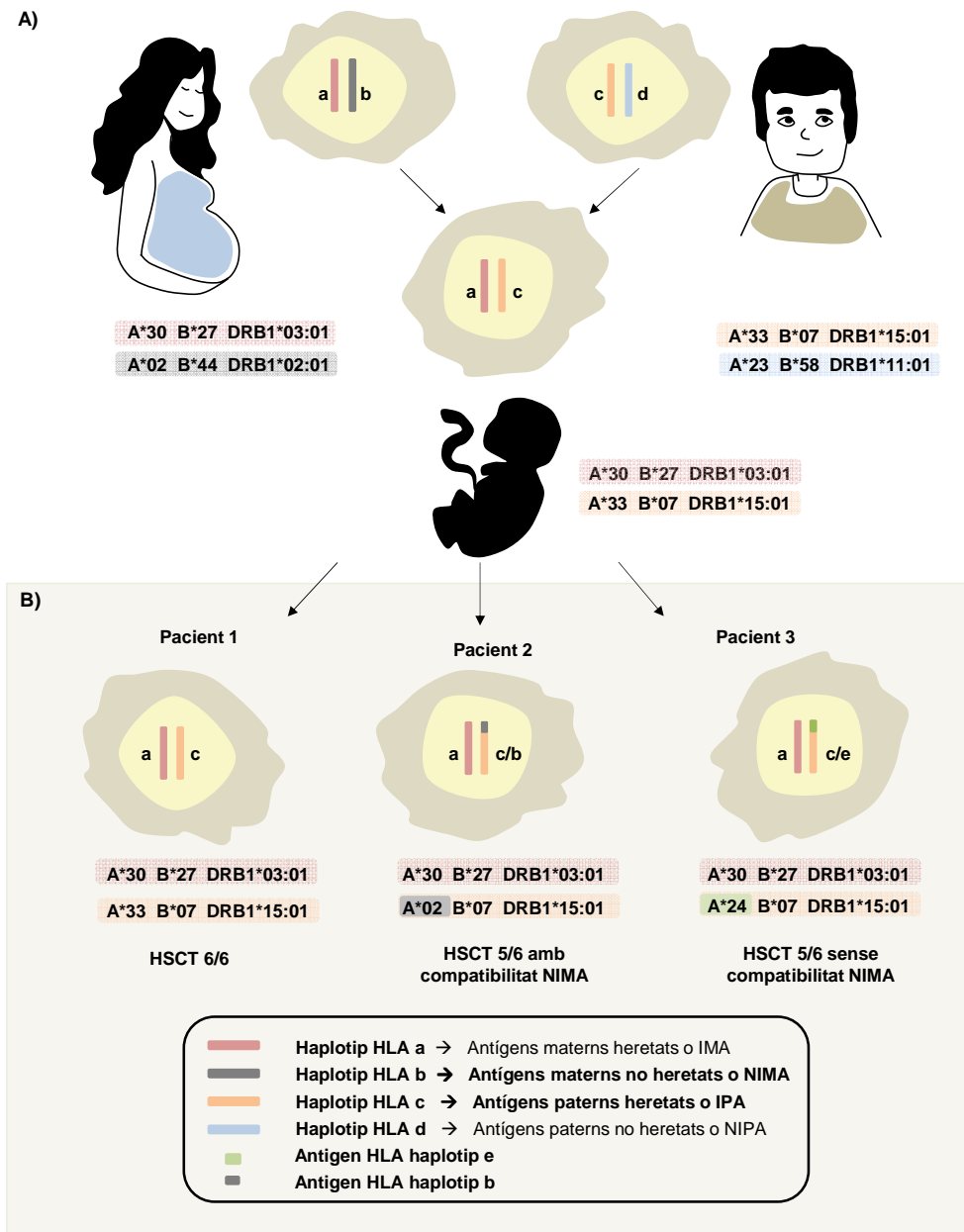


Figura 11. A) Representació dels antígens HLA materns i paterns heretats pel donant de cordó. El donant de cordó hereta un haplotip HLA de la seva mare (IMA) i un haplotip HLA del seu pare (IPA). **B) Possibilitats en el trasplantament de la UCB.** El pacient 1 presenta una compatibilitat 6/6 amb la unitat de UCB, ja que, d'acord amb els criteris convencionals, comparteix els mateixos haplotips HLA. El pacient 2 presenta una incompatibilitat amb la unitat de UCB, però aquesta és compartida amb un antígen de l'haplotip matern que el donant de cordó no ha heretat (hi ha una compatibilitat NIMA entre la UCB i el pacient 2). La incompatibilitat que presenta el pacient 3, en canvi, no és compartida per la mare del donant de cordó (no hi ha compatibilitat NIMA entre la UCB i el pacient 3). Font: elaboració pròpia.

INTRODUCCIÓ

4.6.3 Polimorfisme CCR5-Δ32

Els bons resultats reportats per Hütter i col·laboradors en la generació de resistència a la infecció per HIV en un pacient que va rebre un HSC a partir d'un donant **CCR5-Δ32/Δ32**,⁴⁸ va obrir la porta a la possibilitat d'utilitzar aquest tipus de procediment en altres pacients que tinguessin una infecció per HIV, juntament amb una malaltia hematològica. Com s'ha descrit en apartats previs, aquest polimorfisme, però, es troba en menys de l'1% de la població d'origen Europeu i presenta una prevalença encara més reduïda en altres poblacions.⁴⁵ Això, juntament amb l'elevat grau de compatibilitat HLA que es requereix en un HSCT amb una font adulta, dificulta la cerca d'un donant HLA compatible i amb un genotip CCR5-Δ32/Δ32. Atès que en el trasplantament de UCB és possible utilitzar un menor grau de compatibilitat HLA, es va proposar que aquest tipus de font de progenitors podia ser una bona alternativa per a combatre la infecció del HIV a través del HSCT.²⁰⁷ S'han reportat alguns casos en els quals s'ha utilitzat una unitat de UCB amb la deleció CCR5-Δ32 en homozigosis en pacients amb infecció per HIV que presentaven una malaltia hematològica de base, però en tots ells el receptor va morir pocs mesos després del trasplantament a causa de recaiguda o GVHD.⁵² Duarte i col·laboradors van reportar el cas d'un d'aquests pacients.²⁰⁸ En aquest cas, tot i que el receptor va morir tres mesos després del trasplantament a causa de la progressió del limfoma que patia i no es va poder fer un seguiment dels reservoris virals a llarg termini, 76 dies després del trasplantament i amb un 100% de quimerisme de la unitat de UCB, no es va detectar DNA viral a cèl·lules T CD4⁺ aïllades de sang perifèrica. Així mateix, es va demostrar que els limfòcits T CD4⁺ del pacient no es podien infectar *in vitro* ni amb el mateix virus del pacient, ni amb soques R5 o X4 de laboratori.

Amb l'objectiu de disposar d'un inventari d'unitats de UCB CCR5-Δ32/Δ32 per poder-les utilitzar per a aquest propòsit, alguns bancs de cordó han determinat el genotip CCR5 de les unitats de UCB de forma retrospectiva o l'han incorporat en la seva rutina clínica.²⁰⁹

4.6.4 Altres criteris: ABO, sexe, KIR i IPAs

Diferents autors han analitzat la implicació d'altres variables en els resultats del trasplantament de UCB, entre les quals es troben la compatibilitat ABO, el sexe, els gens KIR i els antígens paterns heretats (IPA). Tot i això, l'absència d'efecte, la presència de dades conflictives o la necessitat de disposar de més evidències científiques que

recolzin el seu ús fan que actualment no es recomani utilitzar-les com a criteri de selecció de les unitats.¹⁰⁸

Pel que fa a la **compatibilitat ABO**, tot i que algun estudi ha descrit la seva associació amb una major supervivència i menor TRM,¹⁸¹ estudis més recents demostren que no té cap efecte en els resultats de trasplantament de UCB.^{210,211} En conseqüència, no hi ha un criteri establert per a la selecció de les unitats de UCB en relació a la compatibilitat ABO.¹⁰⁸

En el context del HSCT a partir d'una font adulta, s'ha vist que aquells trasplantaments on el receptor és de **sexe** masculí i la donant de sexe femení, existeix un major risc de GVHD.²¹² En aquests casos, les cèl·lules de l'empelt reconeixen mAHGs que s'expressen al cromosoma Y i que són polimòrfics, amb els seus homòlegs del cromosoma X.²¹³ Tot i que en el trasplantament de UCB s'ha reportat que els pacients de sexe masculí trasplantats amb unitats de UCB que provenen d'un donant de sexe femení podrien tenir un major risc de GVHD i TRM, disminuint així la supervivència global i lliure de malaltia, són necessaris altres estudis en cohorts més grans de pacients per tal de poder incloure el sexe com a criteri de selecció.^{108,214}

En el cas de la compatibilitat entre els **KIR** i els seus lligands –les molècules HLA de classe I–, la qual està relacionada amb l'alloreactivitat NK, existeixen controvèrsies en els estudis realitzats. Alguns, reporten que la incompatibilitat KIR-lligand en el trasplantament de UCB està associada a un menor risc de recaiguda i a una millora en la supervivència.²¹⁵ Altres, en canvi, no observen cap efecte en la recaiguda ni en la supervivència o bé detecten un impacte negatiu.^{216–218} Per aquest motiu, actualment no es recomana tenir en compte la compatibilitat KIR per a la selecció de les unitats de UCB pel trasplantament.¹⁰⁸

En darrer lloc, en un estudi de Van Rood i col·laboradors, s'ha evidenciat que el microquimerisme matern present a la UCB podria estar implicat en un efecte GVL després del trasplantament de UCB.²¹⁹ En aquest estudi, els pacients amb leucèmia aguda que compartien un o més antígens HLA amb aquells que el donant de cordó havia heretat del seu pare, presentaven un menor risc de recaiguda. Aquest estudi suggereix que les cèl·lules microquimèriques maternes presents a la UCB que han estat sensibilitzades als **IPA** durant l'embaràs, podrien estar reduint el risc de recaiguda a través d'un efecte GVL. Tot i això, són necessaris estudis addicionals per confirmar

INTRODUCCIÓ

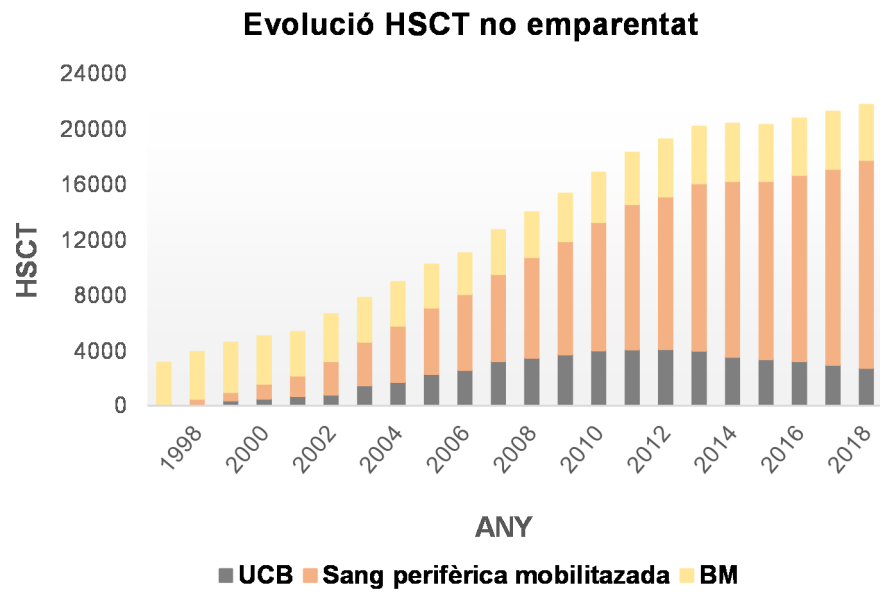
l'efecte que es va observar en aquesta investigació abans de considerar la compatibilitat IPA com a criteri de selecció de les unitats de UCB.¹⁸⁴

4.7 Evolució del trasplantament de sang de cordó umbilical

Inicialment, la UCB s'utilitzava majoritàriament pel trasplantament en pacients pediàtrics, a causa de la limitació en el nombre de cèl·lules i al risc associat de TRM. La millora en la recollida de les unitats, la selecció d'unitats amb una quantitat de cèl·lules major i amb un menor nombre d'incompatibilitats HLA, d'entre altres factors, va permetre millorar els resultats del trasplantament tant en pacients pediàtrics com en adults.¹⁸¹ Tot això, juntament amb l'ús del dCBT i de règims de condicionament menys agressius, va permetre que, a partir del 2004, el nombre d'adults que rebien un trasplantament de UCB augmentés de forma progressiva, principalment per tractar malalties hematològiques malignes.¹³⁴ El nombre de trasplantaments realitzats amb unitats de UCB va anar incrementant fins a l'any 2011. En aquest any, la UCB es va utilitzar com a font de progenitors en gairebé el 20% dels pacients que van rebre un HSCT d'un donant no emparentat.⁶⁶

En els últims anys els resultats del trasplantament de UCB han seguit millorant. Amb una dosi cel·lular i una compatibilitat HLA adequada, els trasplantaments de UCB han demostrat millorar la capacitat d'empelt i la TRM; han mantingut una incidència de GVHD baixa; presentant una supervivència global i lliure de malaltia comparable a l'obtinguda amb les fonts adultes.^{134,179,220-224} Tot i això, a partir de l'any 2011, el nombre de pacients que han rebut un trasplantament de UCB ha anat disminuint gradualment (**Figura 10**), mentre que hi ha hagut un increment en l'ús dels **trasplantaments haploidèntics** (**Figura 11**).^{225,226} Tot i l'elevat grau d'incompatibilitats HLA que presenta aquesta modalitat de trasplantament, s'han desenvolupat diferents estratègies basades en la depleció de cèl·lules T, la utilització de règims de condicionament particulars o l'administració de ciclofosfamida posttrasplantament, amb l'objectiu de prevenir i tractar el GVHD, el que ha contribuït a millorar resultats observats en aquest tipus de trasplantament.^{227,228}

A)



B)

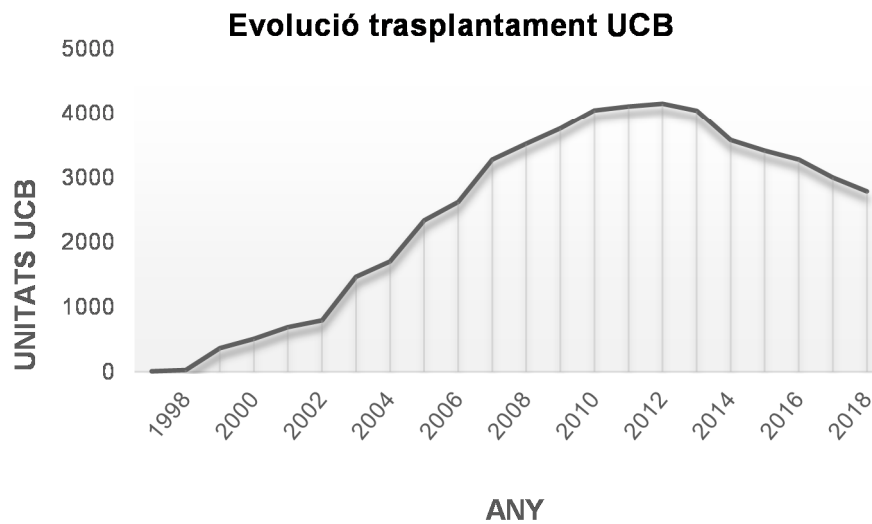


Figura 10. A) Evolució del HSCT, segons el tipus de font. B) Evolució del trasplantament de UCB. Font: adaptades de la *World Marrow Donor Association*.⁶⁶

INTRODUCCIÓ

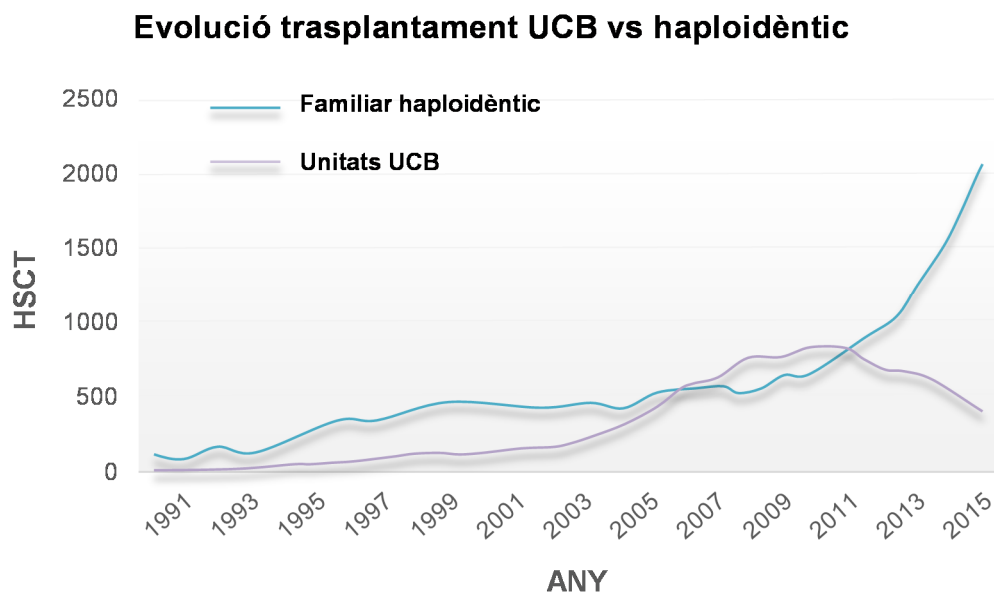


Figura 11. Evolució comparativa del trasplantament de UCB i del trasplantament haploidèntic. Font: adaptada de Passweg *et al.*, 2017.

De forma general, juntament amb el trasplantament de UCB, el trasplantament haploidèntic se l'ha considerat una estratègia alternativa quan no està disponible un donant familiar o un donant adult HLA compatible.^{68,189} Alguns dels principals avantatges que presenta la UCB en comparació amb les fonts adultes són la seva disponibilitat immediata, fet que disminueix el temps d'espera pel trasplantament, i la possibilitat de seleccionar unitats amb uns criteris de compatibilitat HLA menys estrictes sense augmentar la incidència de GVHD. Actualment, el trasplantament haploidèntic també comparteix aquests avantatges i, a més, presenta un cost menor (el preu d'una unitat de cordó està al voltant dels 20.000 euros¹⁸¹) i permet la possibilitat d'utilitzar cèl·lules addicionals del donant en cas de pèrdua de l'empelt o de recaiguda. Aquestes raons podrien explicar l'increment de la utilització del trasplantament haploidèntic i la disminució gradual de la utilització de la UCB. Tot i això, els estudis retrospectius que comparen les dues modalitats no són concloents i encara no hi ha estudis prospectius aleatoritzats que permetin establir quina de les dues estratègies és millor segons el tipus de pacient i la malaltia de base.²²⁷

4.8 Altres usos de la sang de cordó umbilical

A part de la seva utilització en el trasplantament hematopoètic, en els últims anys s'han investigat i desenvolupat altres possibles aplicacions terapèutiques de les cèl·lules de la UCB. Una d'elles és la utilització de les **cèl·lules mare mesenquimals** derivades del

INTRODUCCIÓ

cordó umbilical. Les cèl·lules mare mesenquimals, també conegudes com a cèl·lules mesenquimals estromals, són cèl·lules multipotencials i amb capacitat d'autorenovació. Poden diferenciar-se en cèl·lules del llinatge mesodèrmic, és a dir, cèl·lules del teixit ossi, del teixit cartilaginós i del teixit adipós, i també s'ha reportat la seva capacitat de diferenciar-se en altres tipus cel·lulars. A més, són cèl·lules amb propietats regeneratives i immunomoduladores, motiu pel qual han generat interès en la seva aplicació en diferents àmbits clínics. Tot i que encara no es coneix amb exactitud el seu mecanisme d'acció i existeixen controvèrsies relacionades amb els seus efectes, existeix una gran motivació vers l'estudi de les cèl·lules mare mesenquimals derivades de la UCB i la seva aplicació en un ampli espectre de malalties hematològiques i no hematològiques.^{148,229}

D'altra banda, també s'ha proposat utilitzar la UCB com a font de **cèl·lules progenitores vasculars de tipus endotelial**, donada la seva capacitat de facilitar la reparació del teixit després de dany vascular; de **cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC)**; així com de components no cel·lulars o de plaquetes pel tractament d'úlceres de peu diabètic. En conjunt, l'interès per l'obtenció de cèl·lules progenitores no hematopoètiques derivades de la UCB pel seu potencial en la medicina regenerativa i en tractaments immunomoduladors s'ha incrementat en els últims anys. El fet de tenir les unitats ja disponibles i caracteritzades en els bancs de cordó, facilita la seva aplicació per aquest tipus de teràpies.²²⁹

OBJECTIUS

Tal com s'ha exposat en la introducció d'aquesta tesi doctoral, la sang de cordó umbilical és una font ben establerta de cèl·lules mare pel trasplantament hematopoètic. Des de l'any 1988, més de 35.000 pacients han rebut un trasplantament de sang de cordó umbilical. Entre d'altres, la millora en els criteris de selecció de les unitats de cordó ha tingut una importància cabdal en els resultats del trasplantament. Com a conseqüència, bancs de cordó d'arreu del món han optat per prioritzar aquelles unitats amb una millor qualitat cel·lular, així com disposar d'inventaris més ben caracteritzats, per tal de facilitar la cerca de la millor unitat per cada pacient que requereixi un trasplantament hematopoètic. D'acord amb això, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat **millorar la caracterització de les unitats de cordó de més bona qualitat cel·lular del programa Concordia, mitjançant la determinació del polimorfisme CCR5-Δ32 i la tipificació del gens HLA**. D'aquest propòsit principal, s'han derivat els següents objectius:

- 1. Obtenir un inventari d'unitats de cordó homozigotes pel polimorfisme CCR5-Δ32 a través de la caracterització de més de 8.000 unitats del banc, mitjançant tècniques de biologia molecular dissenyades i desenvolupades al laboratori.**
- 2. Desenvolupar una estratègia de tipificació HLA de molt baix cost basada en la seqüenciació de nova generació, que permeti també la determinació del polimorfisme CCR5-Δ32.**
- 3. Implementar aquesta estratègia en la tipificació dels gens HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 en alta resolució en més de 5.000 unitats de cordó del banc i més de 2.500 mostres maternes.**
- 4. Determinar i analitzar estadísticament les freqüències al·lèliques i haplotípiques HLA en les més de 5.000 unitats de cordó tipificades amb l'estratègia desenvolupada.**
- 5. Analitzar l'impacte de la tipificació HLA en alta resolució de les unitats de cordó i la tipificació HLA materna en la selecció preferent de les unitats pel trasplantament.**

RESULTATS

Els resultats de la present tesi doctoral es presenten com a compendi de publicacions i estan dividits en dues seccions:

Secció 1: Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: polimorfisme *CCR5-Δ32*

Secció 2: Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical: gens HLA

Secció 1.

**Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical:
polimorfisme *CCR5-Δ32***

Article 1: Analysis of the Spanish CCR5-Δ32 inventory of cord blood units: lower cell counts in homozygous donors.

Emma Enrich, Francisco Vidal, Francisco Sánchez-Gordo, Juan M. Gómez-Zumaquero, Antonio Balas, Francesc Rudilla, Luisa Barea, Ana Castro, Luis Larrea, Miguel A. Perez-Vaquero, Isidro Prat, Sergio Querol, Gregorio Garrido, Rafael Matesanz, Enric Carreras and Rafael F. Duarte

Bone Marrow Transplant. 2018 Jun;53(6):741-748

DOI: 10.1038/s41409-018-0114-8

Resum

El cas exitós del pacient amb una malaltia hematològica maligna i una infecció per HIV activa que, després de rebre un trasplantament hematopoètic d'un donant homozigot pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, no va mostrar evidències d'infecció, va suggerir la possibilitat d'utilitzar la sang de cordó umbilical per a la cura de pacients HIV⁺ que requerissin un trasplantament hematopoètic. El menor grau de compatibilitat HLA que es requereix en el trasplantament de sang de cordó umbilical, facilita la cerca d'una unitat compatible que presenti aquest polimorfisme. En aquest sentit, 20.236 amb $\geq 1 \times 10^9$ cèl·lules nucleades totals del registre espanyol, s'han tipificat per tal d'obtenir un inventari d'unitats *CCR5-Δ32* homozigotes. Addicionalment, diferents variables s'han analitzat de forma comparativa en funció del genotip *CCR5* de les unitats, com són el nombre de cèl·lules CD34⁺ i de cèl·lules nucleades totals, així com el grup sanguini ABO, el sexe, la tipificació HLA i l'origen geogràfic i ancestral dels donants de cordó. Del total d'unitats tipificades, 130 (0,64%) han resultat ser homozigotes per la deleció, 2.646 (13,08%) heterozigotes i 17.460 (86,28%) no han presentat la deleció. De manera inesperada, s'ha observat que les unitats homozigotes per la deleció presenten una quantitat significativament menor de cèl·lules CD34⁺. A més, s'ha trobat una associació significativa entre l'origen ancestral dels donants i la presència de la deleció, essent l'origen europeu el més representat en les unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*. En conjunt, ha estat possible l'obtenció d'un inventari relativament extens d'unitats *CCR5-Δ32*, el que facilitarà el desenvolupament d'assaigs clínics per la cura del HIV en pacients que requereixen un trasplantament hematopoètic. Són necessaris més estudis per a poder explicar el menor nombre de cèl·lules observat en el grup d'unitats homozigotes per la deleció, així com esclarir el seu impacte clínic.

RESULTATS

Els resultats de part d'aquest estudi també van ser presentats en forma de:

- Pòster al congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (SCI), titulat **“Development of a *CCR5-Δ32/Δ32* inventory within the best cell quality umbilical cord blood units of the Spanish Registry ”** (Barcelona, Espanya, 2017)

Secció 2.

**Millora de la caracterització de la sang de cordó umbilical:
gens HLA**

Article 2: Improving cord-blood typing with next generation sequencing: impact of allele-level HLA and NIMA determination on their selection for transplantation

Emma Enrich, Francisco Vidal, Irene Corrales, Eva Campos, Nina Borràs, Lluís Martorell, Mar Sánchez, Sergi Querol, Francesc Rudilla

Article en preparació, pendent d'enviar a la revista *Bone Marrow Transplantation*.

Resum

La compatibilitat HLA en alta resolució, juntament amb la compatibilitat dels antígens materns no heretats o NIMA, s'ha associat amb millors resultats de trasplantament. Amb l'objectiu de millorar l'inventari del banc de cordó de Barcelona d'una forma cost-eficient, s'ha desenvolupat una estratègia de tipificació HLA basada en la seqüenciació de nova generació per caracteritzar els gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* en 5.000 unitats de cordó i 2.500 mostres materns associades a aquestes unitats. A més, per tal d'analitzar l'impacte de la tipificació HLA en alta resolució i la determinació dels NIMA en la selecció preferencial de les unitats de cordó pel trasplantament, s'ha realitzat un seguiment, de fins a 17 mesos, de tres grups d'estudi formats per 2.012 unitats cadascun. Les unitats del primer grup, així com les seves respectives mostres materns, presenten una tipificació en alta resolució en *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1*. Les unitats del segon grup també presenten una tipificació HLA en alta resolució, però no tipificació materna, mentre que les unitats del darrer grup es troben tipificades d'acord amb els criteris de selecció convencionals: baixa resolució en *HLA-A* i *-B* i alta resolució en *HLA-DRB1*. Tot i que s'ha observat una major tendència a seleccionar les unitats amb tipificació HLA en alta resolució i tipificació materna, no s'ha pogut demostrar un impacte significatiu de les variables estudiades en la selecció preferent de les unitats. Aquests resultats posen de manifest la necessitat de disposar d'uns criteris de selecció de la sang de cordó ben establerts i reconeguts de manera global, basats en les evidències científiques, així com d'incrementar l'accessibilitat dels clínics a la informació disponible als registres de donants.

RESULTATS

Els resultats de part d'aquest estudi també van ser presentats en forma de:

- Comunicació oral al congrés de la *Sociedad Española de Inmunología* (SEI) titulada “**Validation and implementation of next generation sequencing technology for HLA typing in our laboratory routine**” (Alacant, Espanya, 2016)
- Comunicació oral al *12th International Donor Registry Conference and WMDA working groups meeting* titulada: “**Impact of improving the HLA typing in cord blood inventory on the clinical use**” (Múnich, Alemanya, 2018)
- Pòster al *European Congress of Immunology* titulat “**Implementation of an HLA typing strategy based on Next Generation Sequencing to improve the characterization of umbilical cord blood units**” (Àmsterdam, Països Baixos, 2018)
- Pòster al *33rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference* titulat “**Improvements in HLA typing of the units of the Barcelona Cord Blood Bank through Next Generation Sequencing: impact on clinical use**” (Lisboa, Portugal, 2019)

Improving cord-blood typing with next generation sequencing: impact of allele-level HLA and NIMA determination on their selection for transplantation

Emma Enrich,^{1,2} Francisco Vidal,^{2,3,4} Irene Corrales,^{2,3} Eva Campos,¹ Nina Borràs,^{2,3} Lluís Martorell,^{3,5} Mar Sánchez,⁴ Sergi Querol,^{2,5} Francesc Rudilla^{1,2}

¹*Immunogenetics and Histocompatibility Laboratory, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain*

²*Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona, Spain*

³*Congenital Coagulopathy Department, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain*

⁴*CIBER of Cardiovascular Diseases (CIBERCV), Spain*

⁵*Cell Therapy Unit, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain*

ABSTRACT

Allele-level HLA compatibility in cord blood transplantation, together with non-inherited maternal antigen or NIMA matching, have been associated with better transplant outcomes. The aim of this work is to develop a cost-efficient high-resolution HLA typing strategy based on next generation sequencing to improve the quality of the Barcelona Cord Blood Bank's inventory, and to investigate the impact of high-resolution HLA typing and NIMA determination on the preferential selection of cord blood for transplantation. In this line, the developed strategy was validated and the *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* and *-DQB1* genes of 5,000 cord blood units and 2,500 of their associated maternal samples were typed. Subsequently, three study groups of 2,012 units each were monitored for up to 17 months: 1) units with high-resolution and maternal HLA typing, 2) units with high-resolution but not maternal typing, and 3) units typed at low-resolution for class I and only high-resolution for *HLA-DRB1*. Despite a trend toward a greater selection of units with high-resolution and maternal typing, no significant impact of these variables was observed. These results highlight the need for evidence-based and globally accepted criteria for cord blood selection, together with the necessity to improve the accessibility of clinicians to donor registry's data.

RESULTATS

INTRODUCTION

Umbilical cord blood (CB) is a well-established source of stem cells for hematopoietic transplantation.¹ Compared to adult sources, CB transplantation has been associated with low incidence and severity of graft versus host disease² and, as a consequence, a lower degree of HLA compatibility can be accepted.³ It is established a minimum match of 4 out of 6 considering *HLA-A* and *-B* in low/intermediate resolution and *-DRB1* in high-resolution.⁴ However, some retrospective studies have reported a significant positive impact of a greater degree of compatibility on transplant outcomes.⁵⁻⁹ Eapen and colleagues conducted a large retrospective study with more than 1500 CB transplant data from adult and pediatric patients with hematologic malignancies.⁵ They reported a significantly lower transplant-related mortality (TRM) rate with allele-level matching at *HLA-A*, *-B*, *-C*, and *-DRB1* genes. In a more recent study presented by the same author, a lower TRM and higher overall survival with allele-level HLA compatibility was also observed in a cohort of 1199 pediatric patients with non-malignant diseases.⁹ As a result, the selection of CB with a >5/8 match has been recommended considering these HLA genes typed at high-resolution.^{1,10}

HLA typing of CB donors' mothers has also been proposed to determine non-inherited maternal antigens (NIMA). The fetal immune system, which is in contact with maternal HLA molecules during pregnancy, is believed to develop a tolerogenic response to them.¹¹⁻¹³ In the context of CB transplantation, it has been hypothesized that this may affect graft responses against a recipient's HLA mismatch when the patient shares this mismatch antigen with NIMA. Two retrospective studies have analyzed the impact of fetal exposure to the non-inherited maternal *HLA-A* and *-B* antigens, and *-DRB1* alleles on CB transplantation and found better transplant outcomes after NIMA-matched transplants.^{14,15} These studies support the use of NIMA compatibility in CB transplantation, which would increase the likelihood of finding a compatible unit for patients needing a transplant.¹⁶⁻¹⁸

To address the need for increased HLA compatibility requirements, the development of more fast-track or cost-benefit HLA typing strategies is required. Next-generation sequencing (NGS) has been shown to be a high-throughput technology for HLA genotyping, enabling high-resolution typing and reducing the ambiguities encountered with conventional methods.^{19,20} This technology has therefore been implemented in histocompatibility laboratories worldwide and different strategies have been reported.²¹⁻²⁴ Taking into account this background, a cost-effective HLA typing strategy based on

NGS was developed, with the aim to improve the characterization of the Barcelona Cord Blood Bank inventory. We performed high-resolution HLA typing of the bank's highest quality umbilical CB units (CBUs) and of their associated maternal samples to determine NIMA. Finally, we monitored a subgroup of these CBUs to analyze the impact of the high-resolution HLA typing and NIMA determination on their preferential selection for transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Development of an NGS-Based HLA Typing Strategy

We designed and optimized an NGS-based HLA typing strategy to sequence the most polymorphic exons of *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* and *-DQB1* genes, which consists of three main steps. First, exons 2, 3 and 4 for class I genes, together with exons 2 and 3 for class II genes, are amplified in a single multiplex PCR per sample. In addition, specific regions are simultaneously amplified to determine the ABO blood type, Rh, sex, and the presence of *CCR5-Δ32* deletion. The output is a pool of all amplicons from the same sample, plus a distinctive short sequence identification label that acted as a barcode (Single Direction 384 Barcode for Illumina, Fluidigm, San Francisco, United States), incorporated into each set of PCRs during the amplification step. Second, samples are pooled together, purified using the MinElute Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced in a MiSeq system (Illumina, San Diego, United States) with a 500 cycle MiSeq Reagent Kit (Illumina). Up to 384 samples can be sequenced simultaneously using this strategy. Finally, data analysis is performed using specific software for HLA typing and the CLC Genomics Workbench (Qiagen) for ABO, Rh, sex and *CCR5* genotyping.

To validate this strategy, 672 DNA samples from the Barcelona Blood and Tissue Bank were used. Samples were selected to include almost all the antigens described for each HLA gene and more than 200 different HLA alleles were tested. The validation process was divided into 2 independent runs of 384 samples each. A total of 96 samples from the first run were sequenced again in the second run to test repeatability. For this validation process, both Omixon Target (Omixon Ltd, version 1.9.3) and NGSengine (GenDx, Utrecht, Netherlands, version 1.10.1) were used, together with the IPD-IMGT/HLA Database version 3.27.0 for HLA analysis.

RESULTATS

CBU typing and Comparative Study

CB Selection and Study Design

The Barcelona Cord Blood Bank is a public bank that manages CONCORDIA, a donation program that collects CB from 59 maternity hospitals in 6 Spanish regions and Andorra. The bank currently has over 19,000 cryopreserved CBUs available for transplantation. Of these, we selected 7500 CBUs with $\geq 1.25E9$ total nucleated cell (TNC) counts. Data describing the characteristics of these selected CBUs are presented in **Table S1**. We then randomly divided them into 3 equal groups (n=2500) and performed high-resolution HLA typing of CBUs and maternal typing according to **Figure 1a**. The 3 groups did not present significant differences in TNC and CD34 cell counts (**Figure S1**).

Genomic DNA for HLA typing was obtained from CB and peripheral maternal blood using an automated protocol and following the manufacturer's instructions with the QIASymphony DNA Mini Kit (Qiagen). The NGSengine software (versions 2.5.0.8542 to 2.8.1.10142) and the IMGT/HLA data (3.24.0.1-Core to 3.30.0) were used for HLA typing. Once typed, the HLA information of the CBUs was sent sequentially to the Spanish Bone Marrow Registry (REDMO).

CB Monitoring and Comparative Analysis Between Groups

A subgroup of CBUs was selected to analyze the impact of high-resolution and maternal HLA typing on their preferential selection for transplantation (**Figure 1b**). The different variables analyzed were preliminary report (PR), DNA or extended HLA typing requests, and the number of CBU selected (including reservations and transplants). The time since a PR was sent to the registry/transplant center that requested it until the CBU was sent for transplantation was comparatively analyzed between groups. Finally, in order to be aware of the CB selection criteria used, a questionnaire, along with informed consent, was sent to transplant centers that requested information or selected CBUs for transplantation (**See supplementary material**).

Statistical Analysis

The different parameters analyzed were defined as continuous (TNC, CD34 cell counts and time from PR to transplantation) and discrete (CB collection date; ABO blood type; sex; ancestral origin; HLA typing; number of requests for PR, for DNA and for extended HLA typing; and number of CBUs selected). Continuous data were log-transformed and an ANOVA test was applied. For discrete variables, a χ^2 test was performed. All statistical tests were conducted using GraphPad Prism (version 6.01).

Ethical Considerations and Data Availability

The complete design of the study, together with the use of the samples analyzed in this work was approved by the Vall d'Hebron University Hospital's ethics committee. Specific parts of the developed technique, such as the primer sequences and the PCR condition, are not specified owing to the intellectual property rights of the authors.

RESULTATS

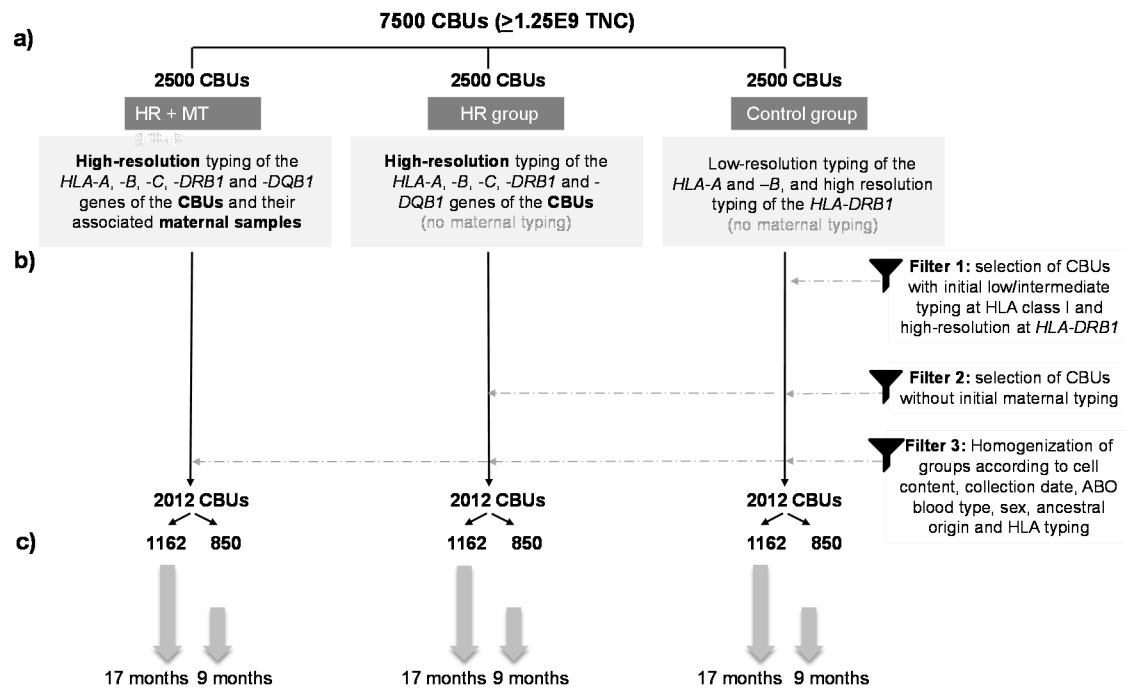


Figure 1. Schematic representation of the study design. **a)** The 7500 CBUs selected for having $\geq 1.25E9$ TNC were divided randomly into three equal groups. At the time of selection, most of them were typed in low-resolution for HLA class I, high-resolution in *HLA-DRB1* and did not present maternal HLA typing. The CBUs of the first group (HR + MT) and their associated maternal samples were typed at high-resolution. The CBUs of the second group (HR) were also typed, but their associated maternal samples were not, while the CBUs of the last group remained typed according to conventional criteria. **b)** A subgroup of these units was selected for follow-up. Not all the CBUs initially selected could be used for monitoring for different reasons: 1) For the control group, we considered the CBUs that presented only low-resolution HLA typing in the HLA class I genes and high-resolution for *HLA-DRB1* at the time monitoring was initiated. 2) For both the HR and the control group, CBUs with previous maternal HLA typing were discarded. 3) Since different parameters were analyzed to verify the similarity between the three groups studied (TNC and CD34 cell counts, cord blood collection date, ABO blood type, sex, ancestral origin and HLA typing), it was necessary to discard some CBUs so that the groups were as homogeneous as possible. **c)** A total of 2012 CBUs per group were finally monitored. Of them, 1162 CBUs per group were analyzed for 17 months, while 850 were monitored for the last 9 months. CBU indicates cord blood unit; HR, high-resolution; MT, maternal typing.

RESULTS

Development and Validation of a NGS-Based HLA Typing Strategy

The 672 DNA samples used in the HLA validation process had been previously characterized with another, already validated, NGS strategy, which is based on full-gene HLA sequencing. Compared with their previous typing, a concordance greater than 99% was found for all loci tested (**Figure 2a**). A representation of the concordance obtained for each HLA allele is shown in **Figures S2-S6**. The average reads per sample obtained was 4.34E6 and 3.63E6 for the first and the second run, respectively (**Figure 2b**). Although depth coverage variability was found between the different exons analyzed (**Figure 2c**), the minimum mean coverage (around 260X in exon 3 for *HLA-B*) allowed an accurate typing. The HLA typing obtained for the 96 repeated samples was exactly the same regardless of the run, indicating that this strategy is repeatable and reproducible.

The determination of the *CCR5-Δ32* polymorphism, together with the ABO blood type, Rh and sex were also validated. For the *CCR5-Δ32* polymorphism, 197 samples which had been characterized with the previously validated NGS strategy were used. For the other variables, 157 samples that came from healthy donors who reported this information at the moment of donation were used. A concordance of 100%, 99%, 100% and 99% was obtained for *CCR5*, ABO blood type, Rh and sex, respectively (**Table S2**). Finally, sequencing quality parameters of the 2 runs performed were within those expected according to the sequencing kit used (**Table S3**).

Improving the CBU Inventory

In order to improve the characterization of the bank's CBUs, we used this strategy to type 5000 high quality CBUs as well as the maternal samples of 2500 of these CBUs. This made it possible to substantially increase to almost 40% and 15% the number CBUs typed at high-resolution and with maternal HLA typing, respectively (**Figure 3**).

RESULTATS

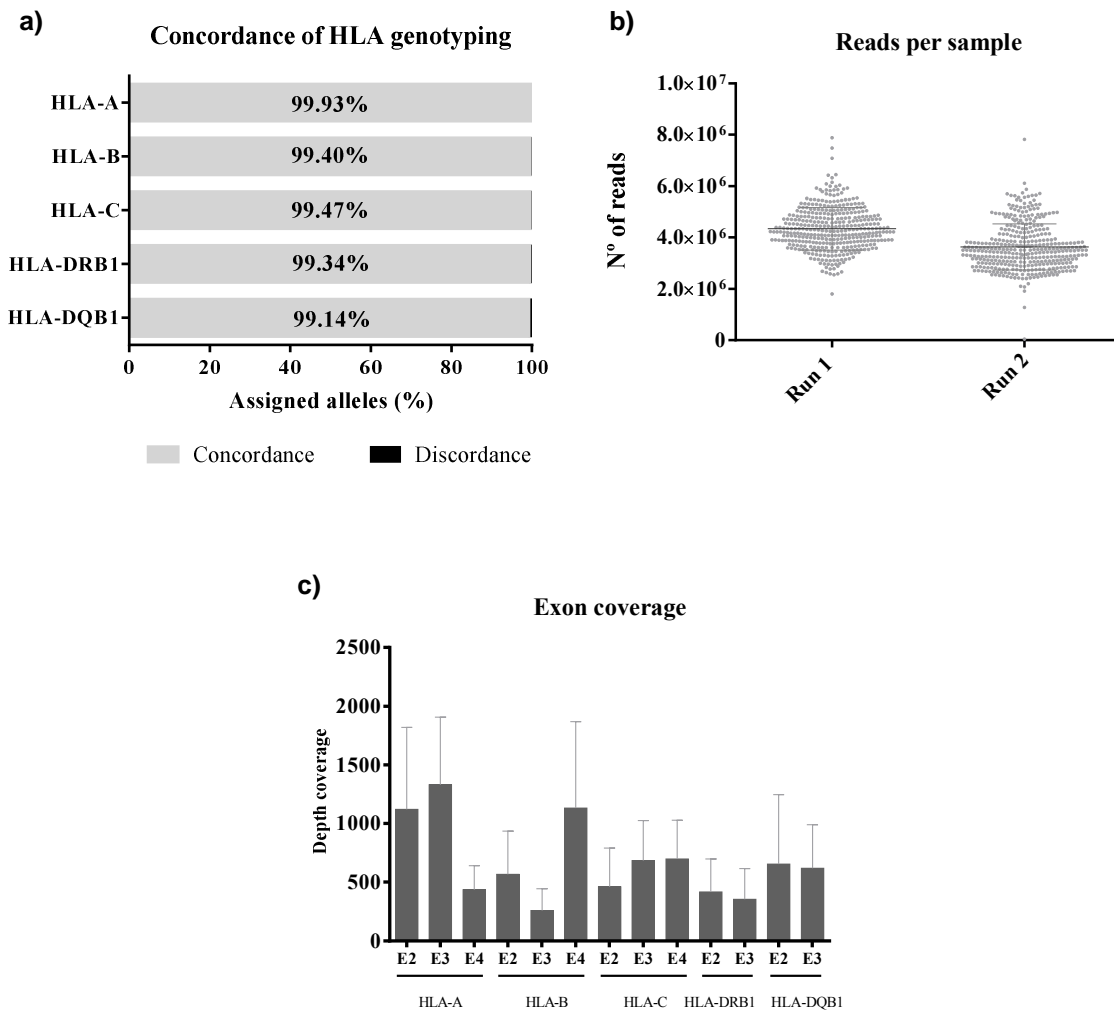


Figure 2. Successful validation of the in-house HLA typing strategy based on NGS. a) Percentage of concordance for each HLA gene between the newly developed NGS-based strategy and the previously full-length validated strategy. The numbers in the grey lines represent the exact percentage of concordance for each locus. b) Number of reads identified for each typed sample (represented as a dot) for the first (Run 1) and the second (Run 2) validation runs. The middle line represents the average reads per sample and the error bars represent the standard deviation. c) Each bar represents the mean depth coverage for each sequenced exon and the error bars represent the standard deviation.

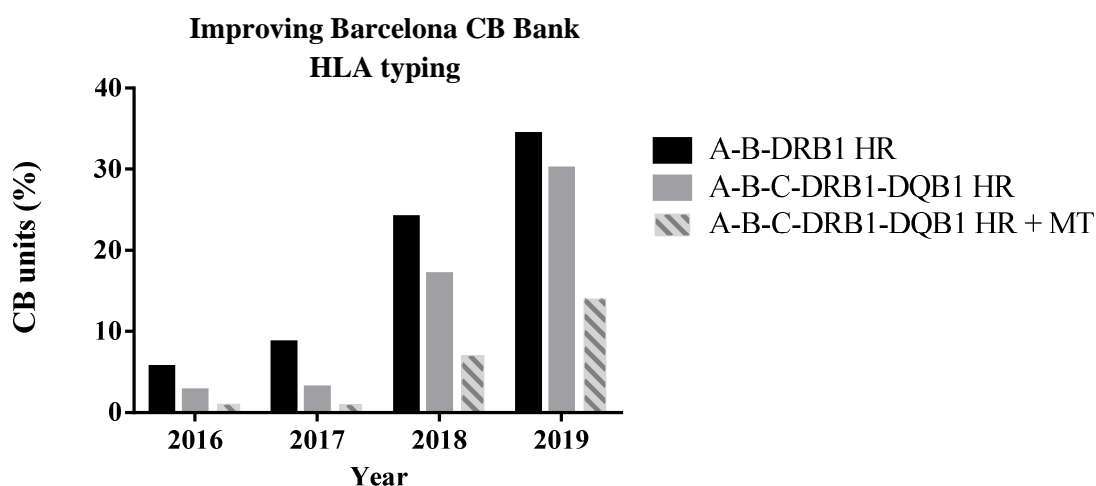


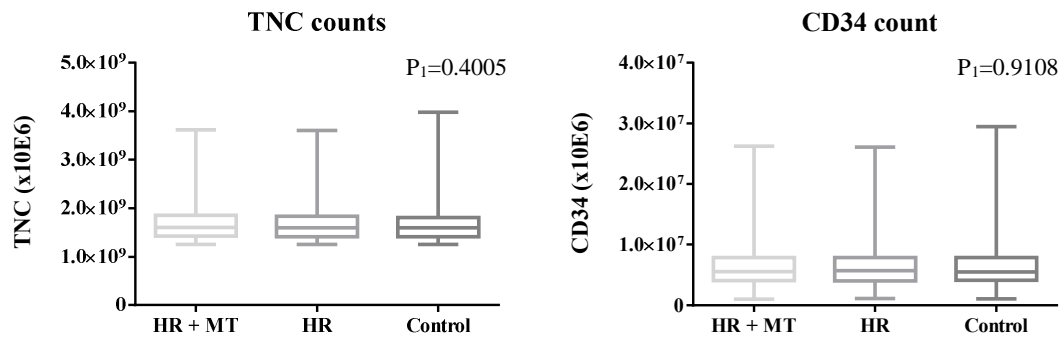
Figure 3. Evolution of the CBUs inventory at the Barcelona CB bank according to high-resolution and maternal HLA typing. For each year, the columns indicate the percentage of active units of the bank with high-resolution HLA typing and with maternal HLA typing. The percentages shown in 2018 are those that appear after the first data dump in January 2018, while the percentages for 2019 include the full data dump. CB indicates cord blood; CBUs, cord blood units; HR, high-resolution; MT, maternal typing.

Impact of High-Resolution HLA and NIMA Determination

A total of 2012 CBUs per group were monitored to analyze the impact of high-resolution and NIMA determination in their selection for transplantation. Since these CBUs were sequentially sent to donor registries, 1162 CBUs per group were followed for 17 months and 850 were followed for the last 9 months (**Figure 1c**). Except for a higher proportion of CBUs with a more recent collection date in the control group for the 850 CBUs followed for 9 months, the study groups did not show significant differences in those variables that could affect CB selection (TNC and CD34 cell content, ABO, sex, ancestral origin or HLA typing) (**Figure 4, S7 and S8**). The number of CBUs transplanted during the study period (January 2018 - May 2019) and since the bank was started is shown in **Figure 5**. Of the 2012 CBUs analyzed per group, 17 CBUs of the high-resolution and maternal typing (HR+MT) group were reserved or transplanted during the study period; while 12 CBUs were selected from the HR group and 11 from the Control group. No significant differences were found between the 3 study groups for any of the variables analyzed, except for the extended HLA typing requests (**Table 1**).

RESULTATS

a) Follow-up 1



b) Follow-up 2

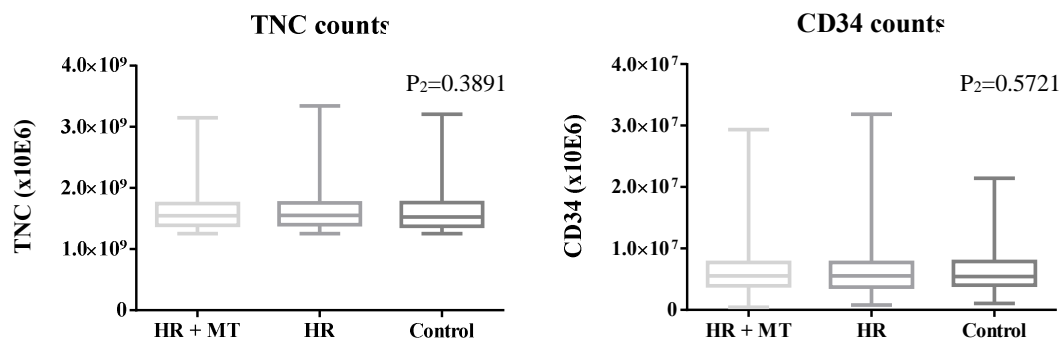


Figure 4. Determination of the three study groups equally divided according to TNC and CD34 cell counts. Boxplots showing the TNC counts and CD34 cells counts for the 1162 CBUs per group followed for 17 months (a) and for the 850 CBUs per group followed for 9 months (b). Box midlines represent the median of the data; the lower limit of the box represents the first quartile (25th percentile); the upper limit represents the third quartile (75th percentile); and whiskers represent minimum and maximum values. The P-values for the ANOVA test are shown for each variable. HR indicates high-resolution; MT, maternal typing; TNC, total nucleated cells.

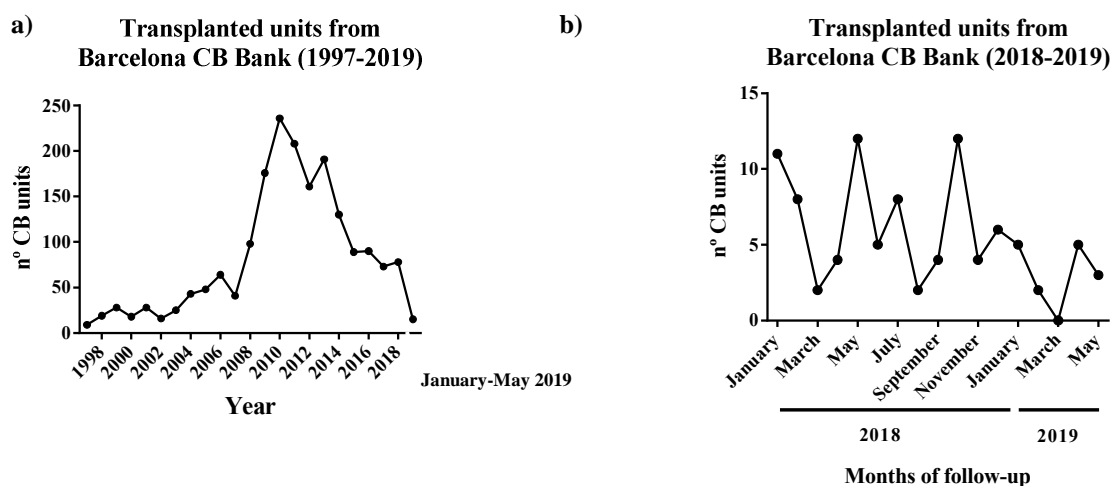


Figure 5. Evolution of the number of transplants from the Barcelona CB Bank. CBU transplanted from Barcelona CB Bank between 1997 and 2019 (a) and during the study period (b). CB indicates cord blood.

Table 1. Results of CBUs monitoring

	HR+MT	HR	Control	P-value
CBUs selection (reservations and transplants)	17	12	11	0.4583
DNA request	16	22	20	0.6144
Extended HLA typing request	0	0	5	0.0067
Preliminary report request	52	49	53	0.9170

CBU indicates cord blood unit; HR, high-resolution; MT, maternal typing

RESULTATS

For those CBUs that were transplanted, we analyzed the time elapsed from a PR being sent to the registry/clinician until the CBU was sent for transplantation (**Figure 6**). The HR+MT group showed the shortest time (mean, 24 days; SD, 6.55), followed by the HR group (mean, 28 days; SD, 12.57) and the control group (mean, 34 days; SD, 10.67). However, no significant differences were observed between them ($P=0.1808$).

Questionnaires were sent to transplant centers that requested information or selected the studied CBUs. Eight of the eleven transplant centers we were able to contact replied the questionnaires (**Figure 7 and Figure S9**). Some transplant centers reported considering a $\geq 5/8$ high-resolution match at *HLA-A*, *-B*, *-C* and *-DRB1*, whereas others use conventional criteria. Accordingly, more than half of them consider that this more stringent criteria is needed for CB transplantation. NIMA compatibility is not used by any transplant center, despite the fact that half of them reported that it should be considered in case of mismatch. Finally, most centers believe that high-resolution should be present in donor registries to facilitate CB selection.

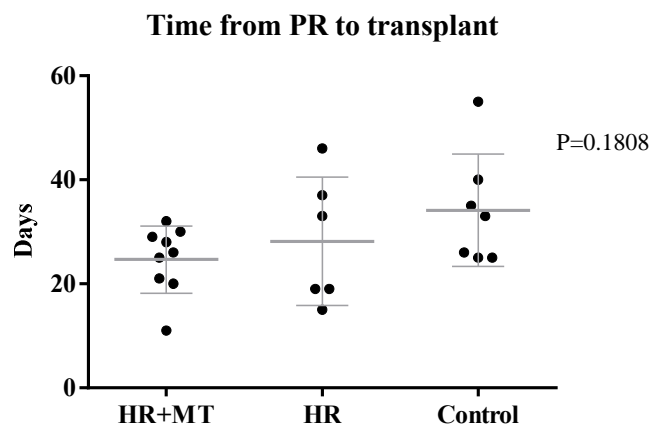


Figure 6. Shorter time from PR to transplant in the group with high-resolution and maternal HLA typing. Each dot represents time from PR to transplant of one CB unit. Central line represents the mean and error bars the standard deviation. The P-values for the ANOVA test are shown. Of the total number of transplanted CB units, no PR was requested for 3 CB units for the HR+MT group, 2 for the HR group and 1 for the Control group, which were excluded from the analysis. Two outliers were identified by the ROUT method ($Q=1\%$) and not taken into account in the analysis (87 days for HR+MT and 84 for Control group). HR indicates high-resolution; MT, maternal typing; PR, preliminary report.

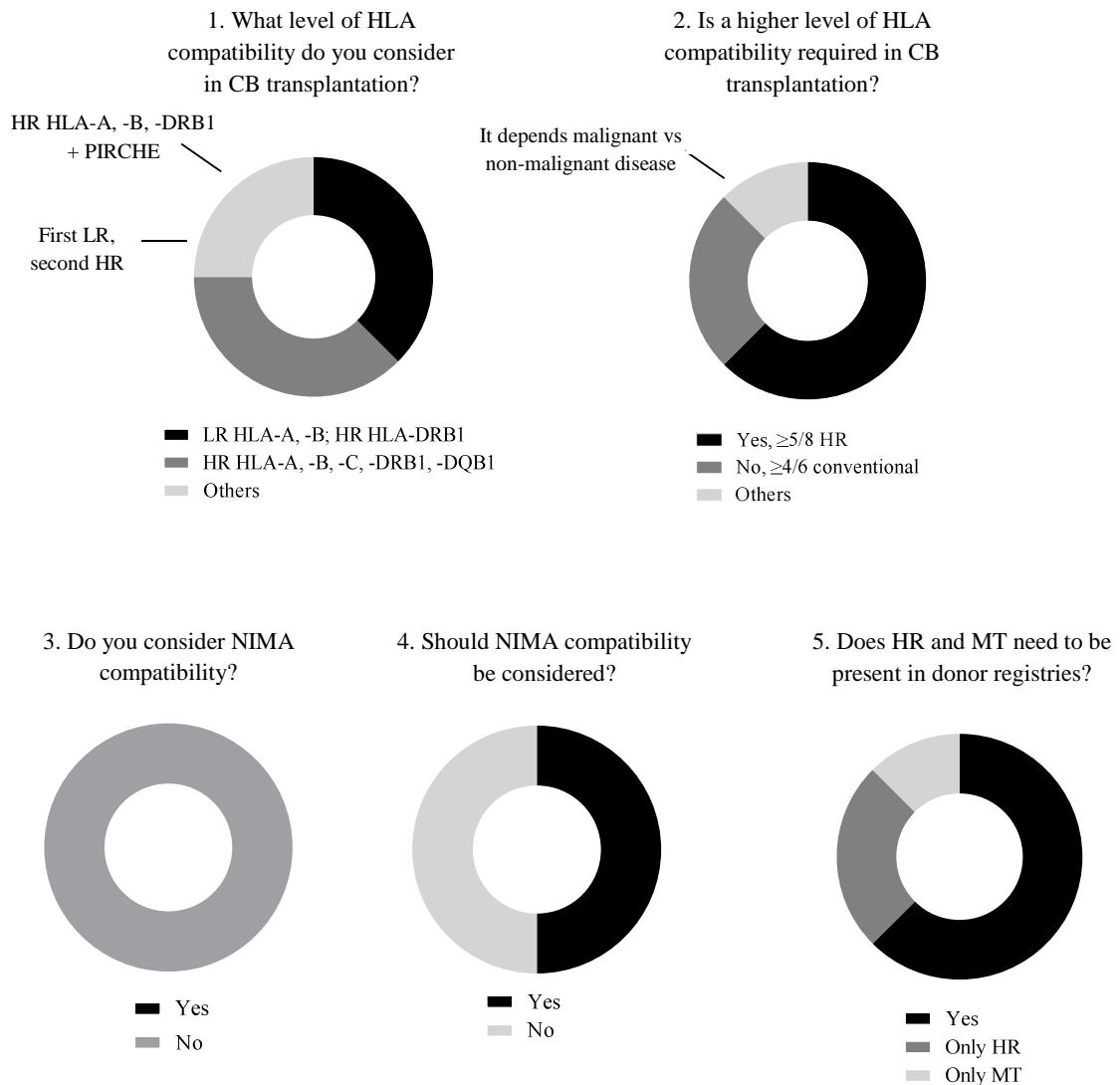


Figure 7. Responses to questionnaires. Exact questions were: **1.** “What level of HLA compatibility do you usually consider when you select cord blood units for transplantation?”, **2.** “Regarding the level of compatibility between the cord blood donor and the recipient, do you think that a more stringent donor selection algorithm is needed?”, **3.** “Do you consider NIMA compatibility when selecting cord blood units for transplantation?”, **4.** “In case of mismatch between the cord blood unit and the recipient, do you think NIMA compatibility should be considered?”, **5.** “Do you think high-resolution HLA typing of the cord blood units and maternal HLA typing need to be present in donor registries to facilitate cord blood selection for transplantation?”. Number of transplant centers participating: 8. HR indicates high-resolution; LR, low-resolution; MT, maternal typing; NIMA, non-inherited maternal antigens.

RESULTATS

DISCUSSION

In this study, we have developed a NGS-based strategy for typing the most polymorphic exons of *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* and *-DQB1* genes, which also makes it possible to determine ABO blood type, Rh, sex, and the *CCR5-Δ32* polymorphism. This new strategy was successfully validated and implemented in routine laboratory practice. It should be noted that during its implementation, minor adjustments were performed to resolve all the discordances found. In addition, due to the importance of identifying the presence of null alleles for hematopoietic transplantation,²⁵ we designed specific primers to detect some of them, such as *HLA-C*04:09N*.

Compared to conventional HLA typing methods, one of the main advantages of this technique is its cost-effectiveness. DNA amplification is performed in a multiplexed PCR, which has made it possible to include determination of some null alleles outside the targeted exons and other non-HLA genes of interest, without increasing costs and hands-on time. In addition, library preparation takes place at the same time as DNA amplification, without the need for a fragmentation step, and up to 384 samples can be paired-end sequenced simultaneously. But most importantly, our novel and robust strategy presented a considerable reduction of phase ambiguities in comparison with sequence by typing (SBT), which is also based on the sequence of the most polymorphic exons. This is due to the NGS technology, which has made it possible to distinguish cis/trans polymorphisms within each exon, as amplicons originated from homologous chromosomes are independently sequenced. Although we could not rule out all those alleles with polymorphisms outside targeted exons, this strategy is particularly appropriate for cost-effective typing of large numbers of samples, such as bone marrow volunteer donors or CBUs for donor registries. Since confirmatory typing is performed when these samples are selected for transplantation, we believe that the use of a more informative but also more expensive typing technique is necessary only at that particular time.

We used this strategy to type 5000 high-quality CBUs and 2500 maternal samples. Since CBUs had been previously typed according to conventional criteria, this made it possible to increase their typing resolution and to detect novel and null alleles. Our goal was not only to improve the characterization of the bank's inventory, but also to analyze whether these improvements facilitate selection for transplantation. Based on the updated recommendations for CB selection considering a $\geq 5/8$ HLA compatibility at allele level, the availability of high-resolution in international registries may facilitate the search for

suitable CBUs for patients who require a hematopoietic transplantation. On the other hand, although two important studies have shown better transplant outcomes using NIMA compatibility,^{14,15} it has been recommended that it be used in prospective studies before being established as a selection criterion. Moreover, maternal HLA typing is largely unavailable in donor registries, which hamper its implementation in clinical practice. Therefore, we expected that CBUs of the HR+MT and HR groups would have been the most selected for transplantation and we did not expect differences between them. However, despite a trend towards a greater selection of CBUs with high-resolution and maternal typing, which was maintained throughout the follow-up, no significant differences were found between the 3 groups.

The greater tendency for selection of CBUs of the HR+MT group was not explained in our study by the use of the NIMA compatibility, since only one NIMA match was observed when analyzing the HLA genotypes of the patient, the mother and the CB. On the other hand, having an extended HLA typing of the CBUs together with the maternal HLA as a confirmation of the CB haplotype at the time of selection may allow a reduction in transplant waiting time and explain this greater trend. Since CB is often used as an alternative option when the search for other stem cell sources is unsuccessful, which increases the urgency of finding a compatible donor, this would reinforce one of the main advantages of CB: its rapid availability. Accordingly, in our study we observed that the mean time from PR request until CB was sent to transplantation was lower for those CBUs with high-resolution and maternal HLA typing. Probably a greater number of transplanted CBUs would have allowed statistical significance to be reached.

However, we cannot conclude that high-resolution and maternal HLA typing have had an impact on the preferential selection of CBUs for transplantation. First, it appears that the best algorithm for selecting CB according to HLA compatibility is not yet well-established worldwide. Although only eight transplant centers participated in our study by responding to questionnaires, we observed considerable diversity in the use of high-resolution and conventional HLA typing. In addition, although all of them reported that they did not consider NIMA compatibility, some of them support its future use if its availability in donor registries increases, while others do not. Second, the method of CB selection differs from country to country and it is not easy to determine whether physicians can access all the information when selecting them. In particular, most of the transplant centers that selected CBUs from the HR+MT group and that replied to the questionnaire reported that they did not have the complete HLA information of the CBUs

RESULTATS

the first time they received information about them. This needs to be addressed by professional organizations such as Worldwide Marrow Donor Association (WMDA) to facilitate full access to the information at physicians' desks and search coordinators to decide the best donor for their patients.

Finally, a limitation of our study is that the number of CBUs transplanted during the study period was low. The use of CB for hematopoietic transplantation has been decreasing since 2011, which has been correlated with an increase in haploidentical transplantation.^{26–28} However, CB transplant outcomes have improved in recent years, showing long-term outcomes comparable to those from adult sources.^{29–32} Improved supportive care and better selection of CB units may have contributed to this. In addition, innovative approaches exist in CB transplantation involving personalized antithymocyte globulin (ATG) administration, which may improve immune reconstitution, indicating that umbilical CB still has its place in hematopoietic transplantation.^{33,34}

In summary, we validated a cost-benefit NGS strategy for high-resolution HLA typing that is applicable to upgrading information on the current CB inventory. Despite a trend towards a greater selection of units with high-resolution and maternal HLA typing and a lower transplant waiting time, the impact of these variables on CB selection was not fully demonstrated. However, based on the current situation of CB, we firmly believe that it is essential for CB banks to improve the quality of their CBUs rather than their quantity. In this regard, efforts should be made to increase the availability of high-resolution and maternal HLA data in donor registries to take advantage of the clinical benefits they can provide, as reported in scientific studies. Finally, these results highlight the strong need for evidence-based and globally accepted criteria for cord blood selection, as well as the necessity to improve the accessibility of clinicians to the information available in donor registries.

Bibliography

1. Hough, R. et al. Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: an update on cord blood unit selection, donor selection algorithms and conditioning protocols. *Br. J. Haematol.* **172**, 360–370 (2016).
2. Kim, Y.-J. & Broxmeyer, H. E. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **79**, 112–26 (2011).
3. Delaney, M. & Ballen, K. K. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 179–187 (2010).
4. Rocha, V., Gluckman, E. & Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant group. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br. J. Haematol.* **147**, 262–74 (2009).
5. Eapen, M. et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood* **123**, 133–140 (2014).
6. Mallhi, K. K. et al. Allele-Level HLA Matching Impacts Key Outcomes Following Umbilical Cord Blood Transplantation for Inherited Metabolic Disorders. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 119–125 (2017).
7. Armstrong, A. E. et al. The Impact of High-resolution HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-DRB1 on Transplant-related Outcomes in Single-unit Umbilical Cord Blood Transplantation in Pediatric Patients. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **39**, 26–32 (2017).
8. Oran, B. et al. Better allele-level matching improves transplant-related mortality after double cord blood transplantation. *Haematologica* **100**, 1361–1370 (2015).
9. Eapen, M. et al. Allele-level HLA matching for umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases in children: a retrospective analysis. *Lancet Haematol.* **4**, e325–e333 (2017).
10. Rocha, V. Umbilical cord blood cells from unrelated donor as an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation in children and adults. *Semin. Hematol.* **53**, 237–245 (2016).
11. Mold, J. E. et al. Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science* (80-.). **322**, 1562–1565 (2008).

RESULTATS

12. Eikmans, M. et al. Naturally acquired microchimerism. *Chimerism* **5**, 24–39 (2014).
13. Dutta, P. & Burlingham, W. J. Microchimerism. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**, 359–365 (2011).
14. van Rood, J. J. et al. Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19952–19957 (2009).
15. Rocha, V. et al. Effect of HLA-Matching Recipients to Donor Noninherited Maternal Antigens on Outcomes after Mismatched Umbilical Cord Blood Transplantation for Hematologic Malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 1890–1896 (2012).
16. Van der Zanden, H. G. M. et al. Noninherited Maternal Antigens Identify Acceptable HLA Mismatches: Benefit to Patients and Cost-Effectiveness for Cord Blood Banks. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1791–1795 (2014).
17. Powley, L. et al. Consideration of noninherited maternal Ags as permissible HLA mismatches in cord blood donor selection. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 675–679 (2016).
18. Kwok, J. et al. Simulation of non-inherited maternal antigens acceptable HLA mismatches to increase the chance of matched cord blood units: Hong Kong's experience. *Hum. Immunol.* **79**, 539–544 (2018).
19. De Santis, D. et al. 16 th IHIW : Review of HLA typing by NGS. *Int. J. Immunogenet.* **40**, 72–76 (2013).
20. Gabriel, C. et al. HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens* **83**, 65–75 (2014).
21. Lange, V. et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* **15**, 63 (2014).
22. Danzer, M. et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: a transition from research to diagnostics. *BMC Genomics* **14**, 221 (2013).
23. Ehrenberg, P. K. et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics* **15**, 864 (2014).
24. Ozaki, Y. et al. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics* **16**, 318 (2015).

25. Elsner, H.-A. & Blasczyk, R. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue Antigens* **64**, 687–695 (2004).
26. Passweg, J. R. et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: Recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. Bone Marrow Transplantation (2015). *Bone Marrow Transplant.* **50**, 476-482 (2015).
27. Liu, J. H., Kanakry, C. G. & Luznik, L. Have haploidentical transplants replaced umbilical cord transplants for acute leukemias? *Curr. Opin. Hematol.* **25**, 103–111 (2018).
28. Passweg, J. R. et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant.* **52**, 811–817 (2017).
29. Eapen, M. et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* **369**, 1947–1954 (2007).
30. Brunstein, C. G. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* **116**, 4693–4699 (2010).
31. Atsuta, Y. et al. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 780–787 (2012).
32. Keating, A. K. et al. The influence of stem cell source on transplant outcomes for pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **3**, 1118–1128 (2019).
33. de Koning, C., Admiraal, R., Nierkens, S. & Boelens, J. J. Immune reconstitution and outcomes after conditioning with anti-thymocyte-globulin in unrelated cord blood transplantation; the good, the bad, and the ugly. *Stem Cell Investig.* **4**, 38–38 (2017).
34. Castillo, N. et al. Early and Long-Term Impaired T Lymphocyte Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation with Antithymocyte Globulin. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 491–497 (2017).

RESULTATS

Supplementary information

The questionnaire, together with the informed consent is presented in this section.

INFORMED CONSENT FOR THE COMPLETION OF A QUESTIONNAIRE

Title of research project: Application of New Generation Sequencing technologies to optimize the selection of umbilical cord blood units for transplantation

PhD student: Emma Enrich Randé (Autonomous University of Barcelona)

Directors: Dr. Francesc Rudilla Salvador; Dr. Sergi Querol Giner

Description and purpose of the research:

This research project is carried out at the Blood and Tissue Bank (BST) of Barcelona, in its Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory and Cord Blood Bank. The objective of this study was to perform high-resolution HLA typing of the Bank's best cell quality cord blood units and their respective maternal samples and to analyse the effect of these improvements on their preferential selection for transplantation.

For this purpose, we selected 7,500 units with $\geq 1.25E09$ total nucleated cells and randomized them into three equal groups. The units of the first group and also their associated maternal samples were typed with an in-house developed Next Generation Sequencing based strategy for the HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 gene typing. The units of the second group were also typed, but not their associated mothers. Lastly, the units of the third group were used as a control group, as they remained typed according to conventional criteria (low-resolution for HLA-A, -B (and -C) and high-resolution for HLA-DRB1). Once typed, the HLA information of these units was sent to the Spanish Bone Marrow Registry and we have performed a 14-month follow-up for 1,162 units per group and also a 6-month follow-up for 850 units per group. We have not only analysed the number of cord blood units per group that have been transplanted, but also the preliminary report, DNA and extended typing requests, and the number of reservations.

In order to better understand the reason of the selection of the units, we have sent this questionnaire to physicians that have requested information, reserved or have selected these studied units for transplantation. In this sense, this study will help us to know whether it is necessary to improve the HLA characterization of cord blood units in donor registries to facilitate their selection for transplantation.

What you will be asked to do in the study: We will ask you to answer a questionnaire to know your opinion on the use of high-resolution HLA compatibility and NIMA compatibility on the selection of cord blood units for transplantation. Additionally, we will ask you the reason why you were interested on these units or selected them for transplantation.

Confidentiality: Your identity will be confidential and only the research team will have access to the data. The informed consent will be kept in a safe place by the principal investigators.

Voluntary participation: Your participation in this study is completely voluntary.

Right to withdraw from the study: You have the right to withdraw from the study at any time without consequences; you will have only to communicate this to Emma Enrich Randé.

Possible publication: The content of the questionnaires will be a part of Emma Enrich Randé's doctoral thesis and it may be used in the manuscript of the doctoral thesis, in academic publications and in congresses communications. In all cases, the identity of all participants will remain anonymous.

Who to contact if you have any questions about the study: For any doubt or consultation you can contact with: Emma Enrich Randé (eenrich@bst.cat); Dr. Francesc Rudilla (frudilla@bst.cat); and Dr. Sergi Querol (squerol@bst.cat)

Consent:

- I have read the information about the research project and have had the opportunity to pose questions.
- I understand that the content of the questionnaires will be analysed and could be published in a scientific report, but that my identity will remain anonymous.
- I agree to participate voluntarily and have received a copy of this consent.

Name and surname of the participant:

Signature _____ Date: _____

RESULTATS

Researcher:

Signature _____ Date: _____

Groups of study:

Group A (control group)

- Cord blood units with low-resolution typing for HLA-A, -B (-C) and only high-resolution typing for DRB1
- No maternal typing

Group B

- Cord blood units with high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 and –DQB1 typing
- Maternal samples with high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 and –DQB1 typing

Group C

- Cord blood units with high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 and –DQB1 typing
- No maternal typing

RESULTATS

Questionnaire:

Part I. Objective: To know which results you would expect from the study, and your opinion about the importance that is given globally to the high-resolution HLA compatibility of the cord blood units and to the NIMA compatibility.

1. Which study group would you expect to have a higher number of transplants?
 - a. Group B (cord blood units with high-resolution HLA typing + maternal typing)
 - b. I would not expect differences between groups B and C
 - c. I would not expect differences between any of the three groups
 - d. Other options: _____

2. Do you think there is a global tendency to select units with a high-resolution HLA-A, -B, -C, and -DRB1 compatibility with the receptor?
 - a. Yes
 - b. No
 - c. Other options: _____

3. Do you think the selection of these units would be favoured if their high-resolution HLA information were more available in donor registries?
 - a. Yes
 - b. No
 - c. Other options: _____

4. Do you think that NIMA compatibility is taken into account in the selection of cord blood units for transplantation?
 - a. Yes
 - b. No
 - c. Other options: _____

5. Do you think that if maternal HLA information were more available in donor registries, NIMA compatibility would be considered more in the selection of cord blood units?

- a. Yes
- b. No
- c. Other options: _____

Part II. Objective: To understand the reasons why the units studied were requested or selected for transplantation.

1. What level of HLA compatibility do you usually consider when you select cord blood units for transplantation?

- a. Low-resolution for HLA-A and HLA-B; high-resolution for HLA-DRB1
- b. High-resolution for HLA-A, -B, -C, and -DRB1
- c. Other options: _____

2. Do you consider NIMA compatibility when selecting cord blood units for transplantation?

- a. Yes. What level of compatibility do you use for NIMA matching?
 - a.1. Low-resolution for HLA-A and HLA-B; high-resolution for HLA-DRB1
 - a.2. High-resolution for HLA-A, -B, -C, and -DRB1
 - a.3. Other options: _____

- b. No
- c. Other options: _____

3. Please answer in the table the following questions for each cord blood unit selected in your institution:

Units from the group A (control group) selected in your institution

3.1 Which is the criterion you followed in order to select a cord blood unit typed according conventional recommendations instead of a high-resolution HLA typed unit?

RESULTATS

a. It was the cord blood unit that best suited to the recipient in terms of cell content.

b. It was the cord blood unit that best suited to the recipient in terms of HLA matching.

c. Other options: _____

Cord blood unit	Type of selection*	Select correct answer for question 3.1	Comments
Cord blood unit 1		a. b. c.	
...			

*Type of selection: preliminary report request, DNA request, reservation, transplantation

Units from the group B (high-resolution HLA typing +maternal typing) selected in your institution

3.1 The first time you received information of this cord blood unit, did it contain high-resolution HLA typing and maternal HLA typing?

a. Yes

b. No, only when I received the preliminary report.

c. No, I did not know this unit had high-resolution HLA and maternal HLA typing when I selected it.

If you have answered “a” or “b” continue with this question:

3.2. Do you think that having the high-resolution HLA and maternal typing available in the registry influenced your decision to select this cord blood unit?

a. Yes. Why? (several options can be selected)

RESULTATS

a.1. A better characterization of the units gave me more **confidence** at the moment of selection: the maternal haplotype information confirmed the typing of the cord unit and, furthermore, I sensed that the typing had been done in a better qualified laboratory.

a.2. Having the high-resolution HLA typing of the cord blood units and the confirmatory information of the maternal HLA in the registry prior to the selection of the unit allowed/would have allowed to **reduce transplant waiting time**.

a.3. I sought high-resolution HLA **compatibility** in all or almost all of these genes between the cord unit and the recipient and NIMA compatibility in the selection of the unit.

a.4. Other options: _____

b. No. Why? _____

Cord blood unit	Type of selection*	Question 3.1	Question 3.2	Reason	Comments
Cord blood unit 1		a.	a.	a.1.	
		b.		a.2.	
			a.3.		
				a.4.	
			b.	–	
		c.	–	–	
...		a.	a.	a.1.	
		b.		a.2.	
			a.3.		
				a.4.	
			b.	–	
		c.	–	–	

RESULTATS

*Type of selection: preliminary report request, DNA request, reservation, transplantation

Units from the group C (high-resolution HLA typing) selected in your institution

3.1 The first time you received information of this cord blood unit, did it contain high-resolution HLA typing?

a. Yes

b. No, only when I received the preliminary report.

c. No, I did not know this unit had high-resolution HLA and maternal HLA typing when I selected it.

3.2. Do you think that having the high-resolution HLA typing available in the registry influenced your decision to select this cord blood unit?

a. Yes. Why? (several options can be selected)

a.1. A better characterization of the units gave me more **confidence** at the moment of selection: I sensed that the typing had been done in a better qualified laboratory.

a.2. Having the high-resolution HLA typing in the registry prior to the selection of the unit allowed/would have allowed to **reduce transplant waiting time**.

a.3. I sought high-resolution HLA **compatibility** in all or almost all of these genes between the cord blood unit and the recipient in the selection of the unit.

a.4. Other options: _____

b. No. Why? _____

RESULTATS

Cord blood unit	Type of selection*	Question 3.1	Question 3.2	Reason	Comments
Cord blood unit 1		a.	a.	a.1.	
		b.		a.2.	
			a.3.	a.4.	
			b.	–	
		c.	–	–	
...		a.	a.	a.1.	
		b.		a.2.	
			a.3.	a.4.	
			b.	–	
		c.	–	–	

*Type of selection: preliminary report request, DNA request, reservation, transplantation

RESULTATS

Part III. Objective: To understand the importance you believe that should be given globally to high-resolution HLA compatibility of the cord blood units and NIMA compatibility.

1. Regarding the level of compatibility between the cord blood donor and the recipient, do you think that a more stringent donor selection algorithm is needed?

a. Yes. I think that an $\geq 5/8$ high-resolution HLA-A, -B, -C and -DRB1 compatibility should be considered.

b. No. I think conventional criteria of $\geq 4/6$ based on low-resolution for HLA-A and -B and high-resolution for HLA-DRB1 has to be considered.

c. Other options: _____

2. Do you think more stringent algorithms would make more difficult the search of a compatible cord blood unit?

a. Yes

b. No

c. Other options: _____

3. In case of mismatch between the cord blood unit and the recipient, do you think NIMA compatibility should be considered?

a. Yes

b. No

c. Other options: _____

4. Do you think high-resolution HLA typing of the cord blood units and maternal HLA typing need to be present in donor registries to facilitate cord blood selection for transplantation?

a. Yes

b. No

Supplementary figures

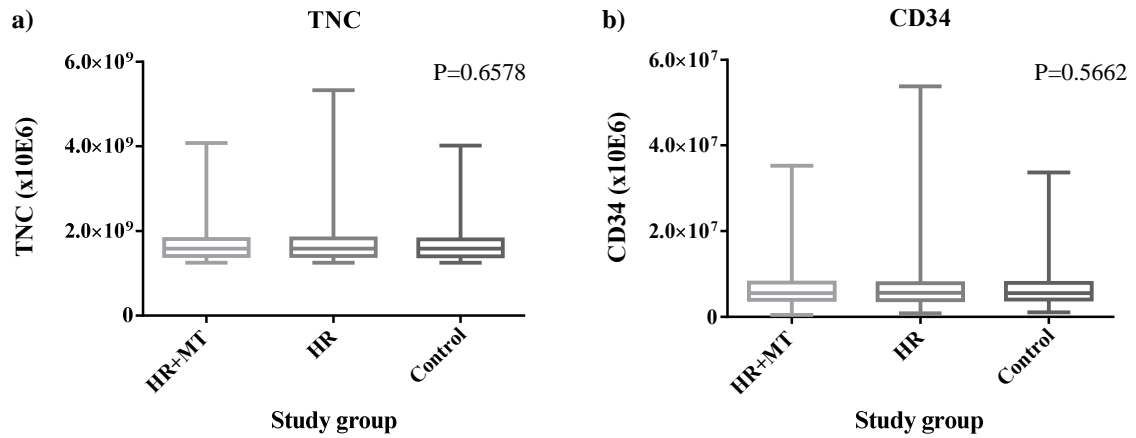


Figure S1. Value distribution of the three groups according to TNC and CD34 cell counts. Boxplots showing the TNC counts (a) and CD34 cells counts (b) of the three study groups of 2500 CBUs each. Box midlines represent the median of the data; the lower limit of the box represents the first quartile (25th percentile); the upper limit represents the third quartile (75th percentile); and whiskers represent minimum and maximum values. The P-values for the ANOVA test are shown for each variable. HR indicated high-resolution; MT, maternal typing; TNC, total nucleated cells.

RESULTATS

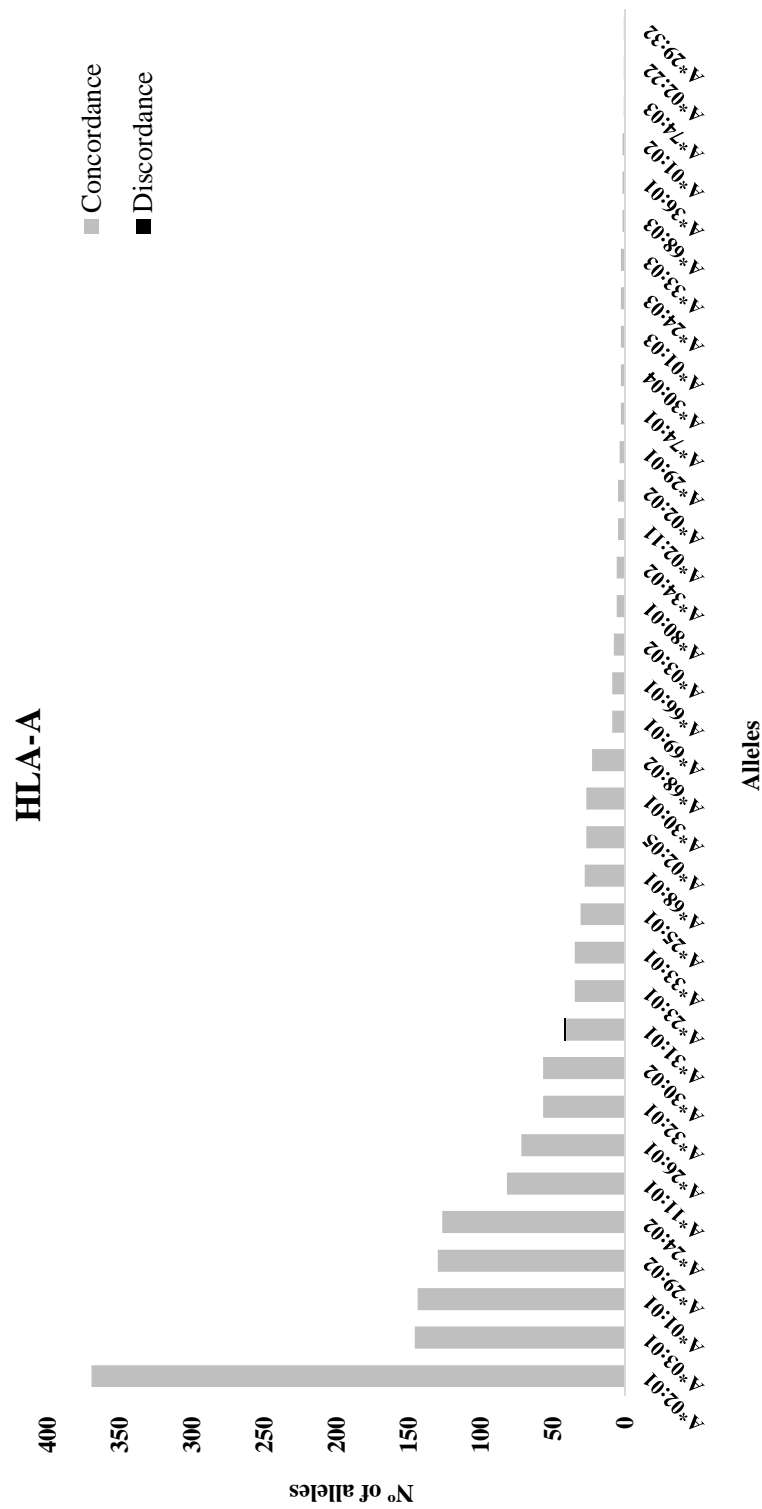


Figure S2. Concordance of the HLA-A locus. Each column represents the number of times each HLA-A allele has been identified. The grey fraction represents the number of alleles concordant with the previous validated strategy, while the black fraction represents the number of alleles that were not correctly assigned with the new HLA typing technique.

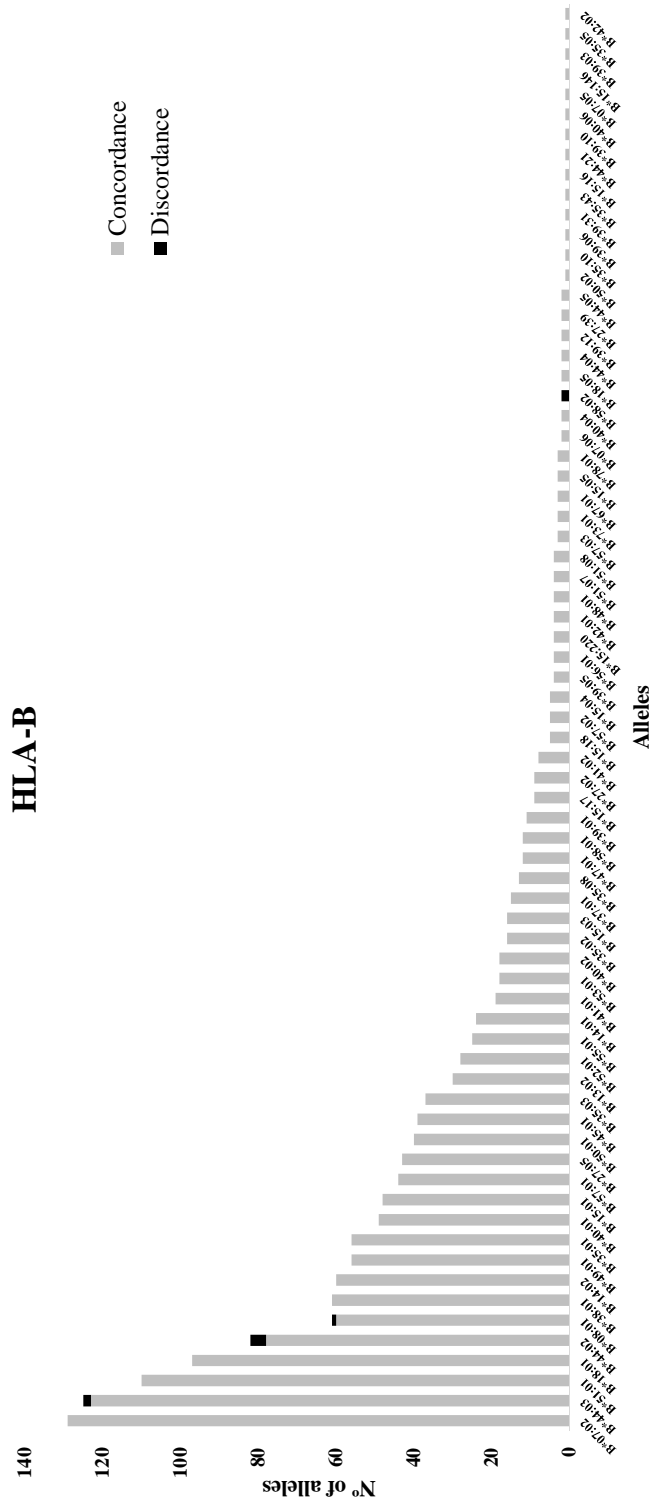


Figure S3. Concordance of the HLA-B locus. Each column represents the number of times each HLA-B allele has been identified. The grey fraction represents the number of alleles concordant with the previous validated strategy, while the black fraction represents the number of alleles that were not correctly assigned with the new HLA typing technique.

RESULTATS

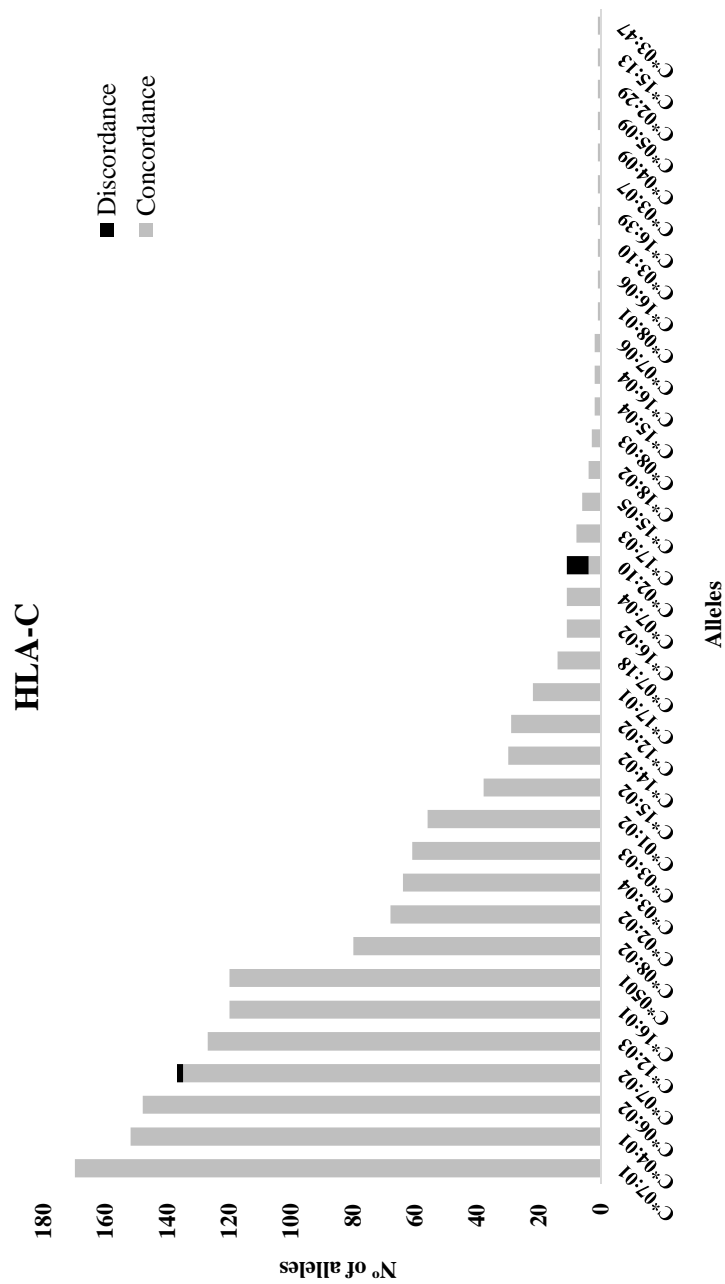


Figure S4. Concordance of the HLA-C locus. Each column represents the number of times each HLA-C allele has been identified. The grey fraction represents the number of alleles concordant with the previous validated strategy, while the black fraction represents the number of alleles that were not correctly assigned with the new HLA typing technique.

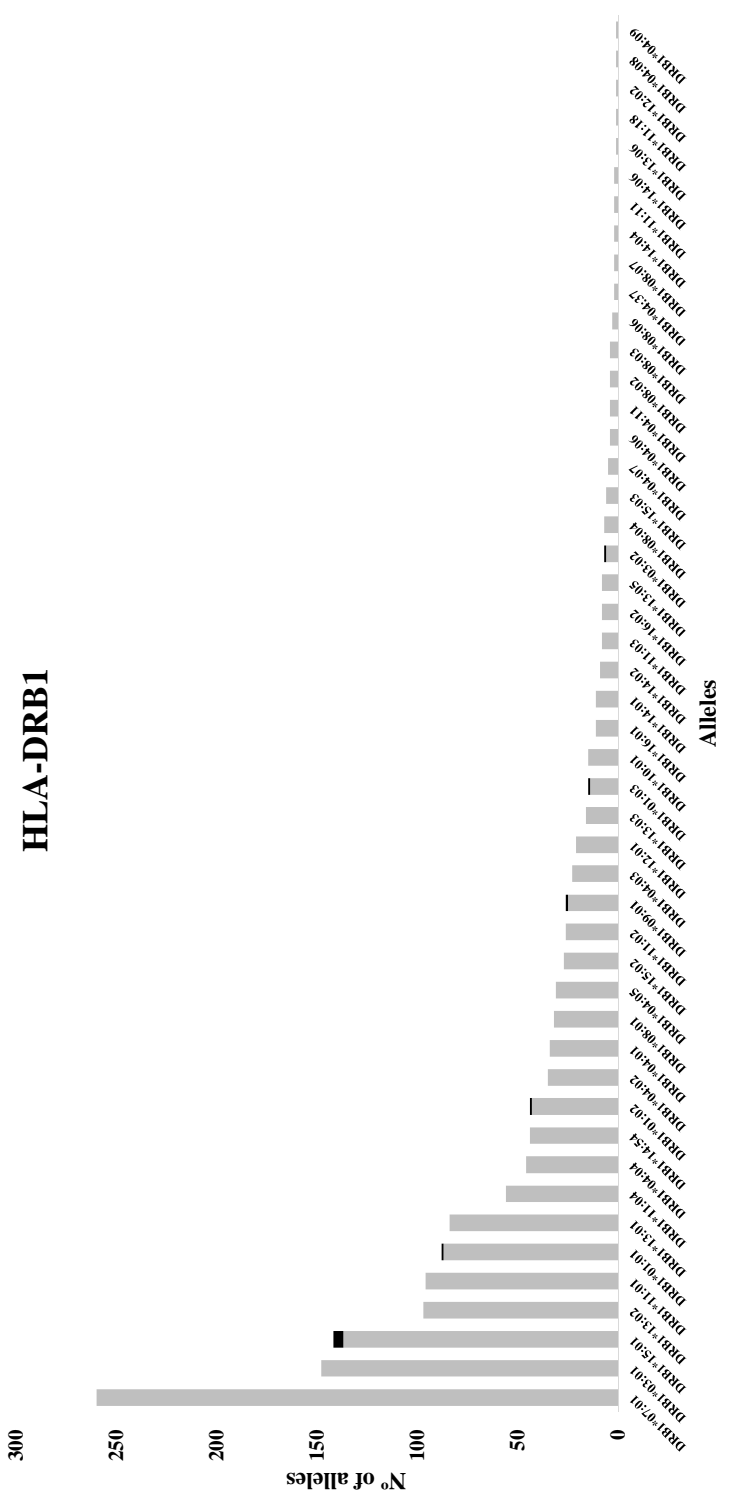


Figure S5. Concordance of the HLA-DRB1 locus. Each column represents the number of times each HLA-DRB1 allele has been identified. The grey fraction represents the number of alleles concordant with the previous validated strategy, while the black fraction represents the number of alleles that were not correctly assigned with the new HLA typing technique.

RESULTATS

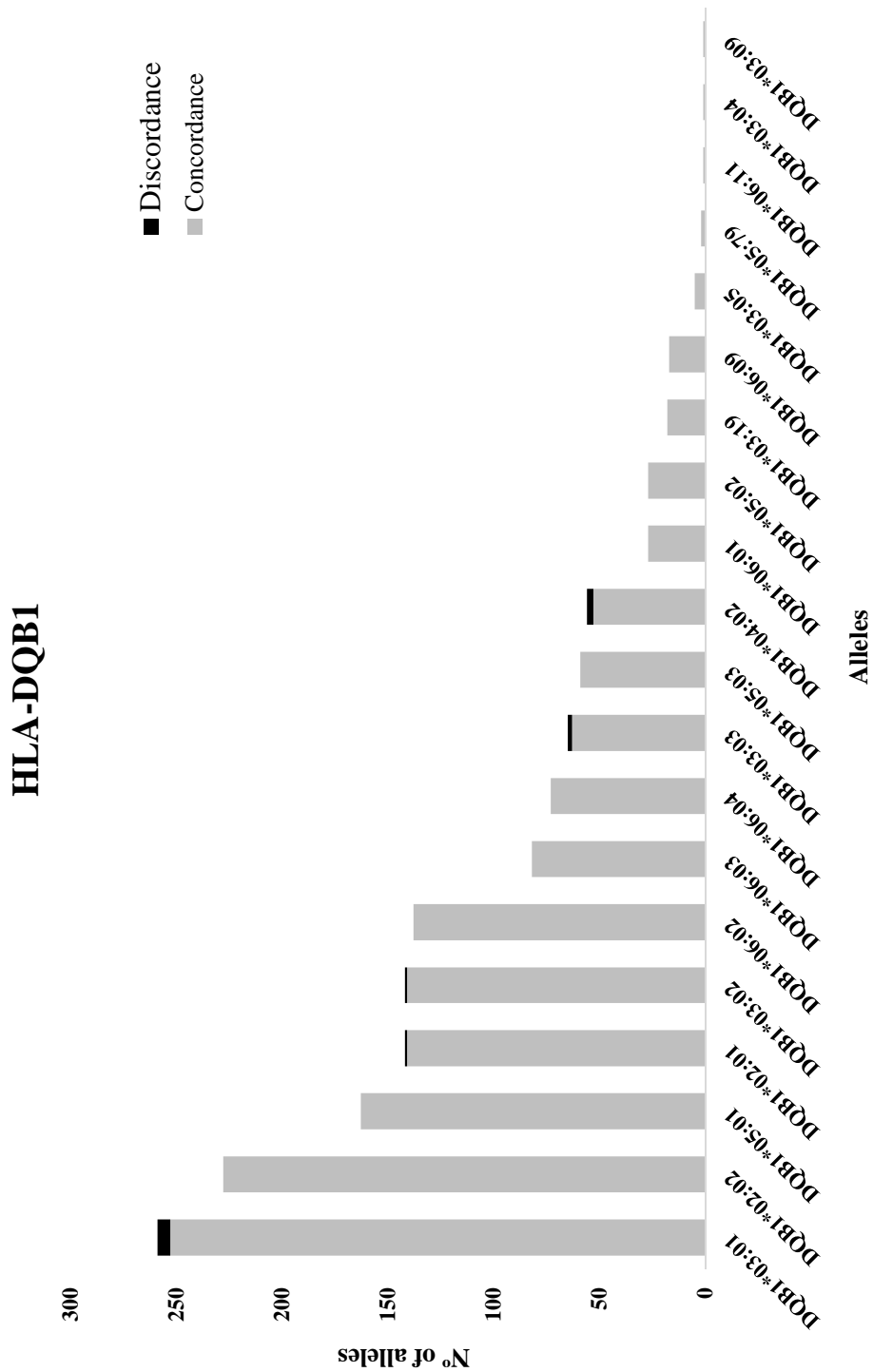


Figure S6. Concordance of the HLA-DQB1 locus. Each column represents the number of times each HLA-DQB1 allele has been identified. The grey fraction represents the number of alleles concordant with the previous validated strategy, while the black fraction represents the number of alleles that were not correctly assigned with the new HLA typing technique.

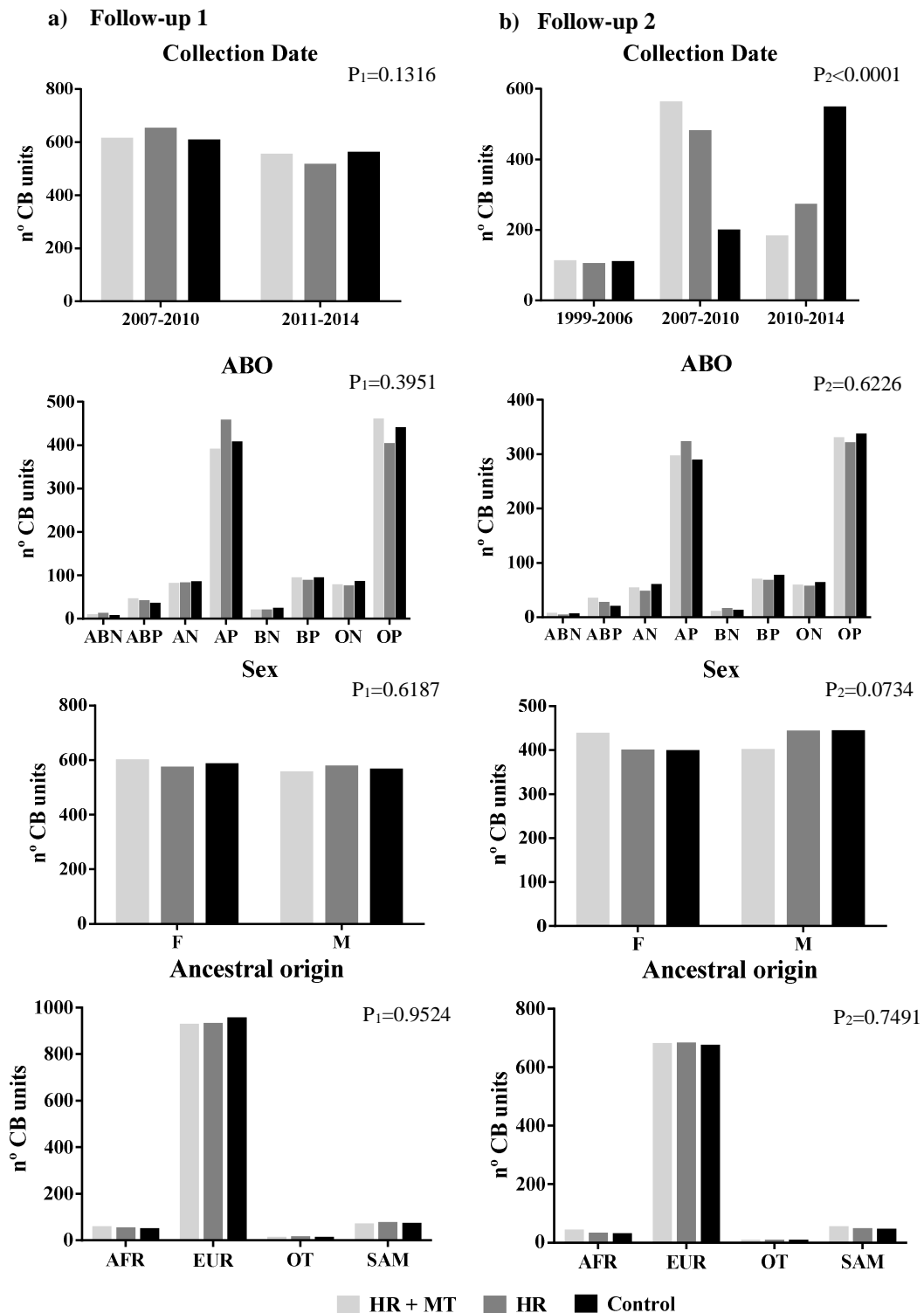


Figure S7. Comparative analysis of the three study groups according to date of collection, blood type, sex and ancestral origin. a) Follow-up 1 represents the 1162 CBUs per group monitored for 17 months. b) Follow-up 2 represents the 850 CBUs per group monitored for 9 months. The P-values for the Chi-Squared test are shown for each variable. For ancestral origin, “others” represent those units from donors with less represented ancestral origins. F indicates female, HR, high-resolution; M, male; MT, maternal typing.

RESULTATS

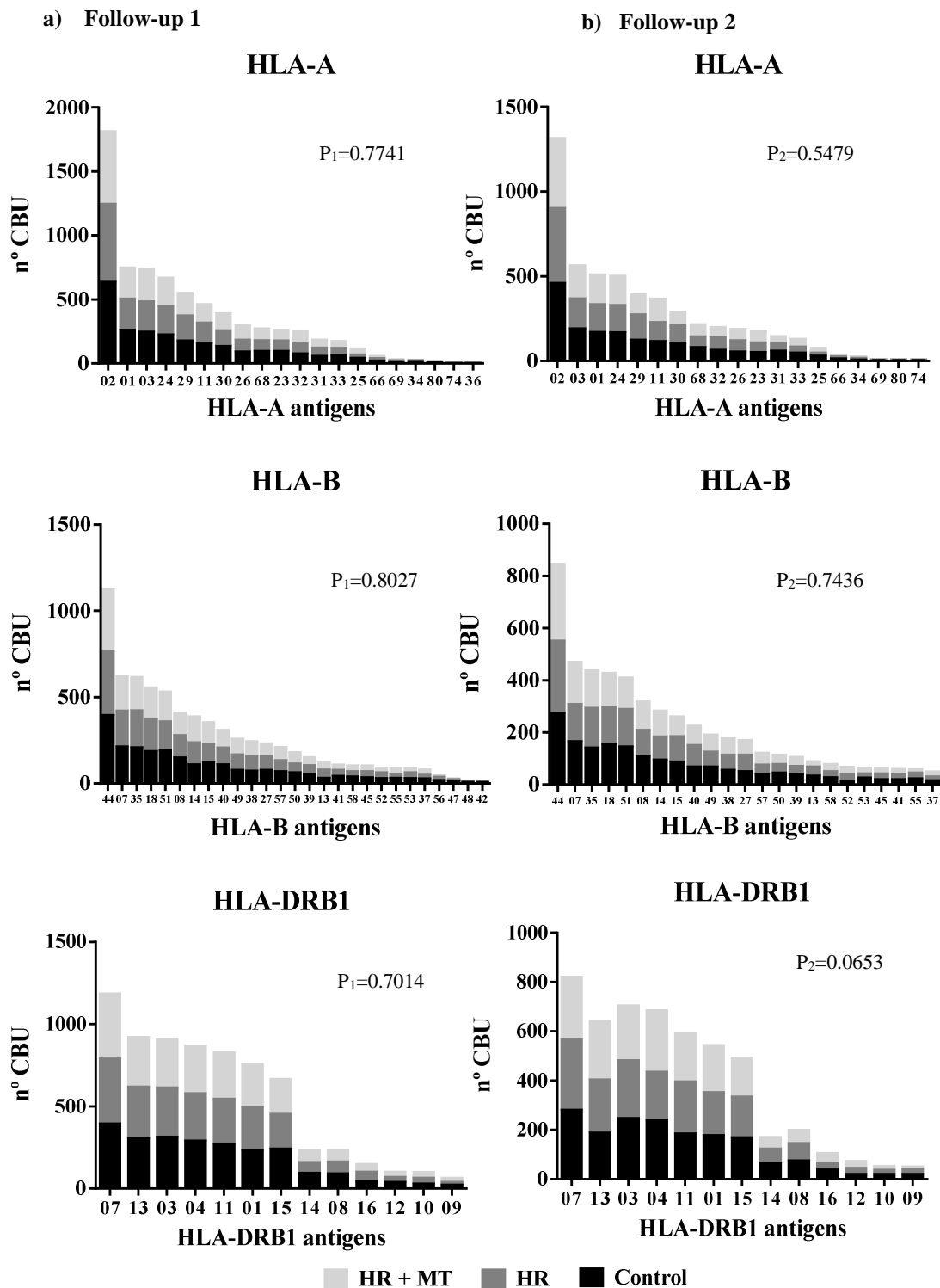
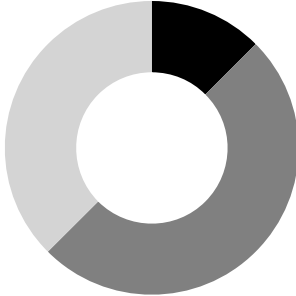


Figure S8. Comparative analysis of the three study groups according to HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1. a) Follow-up 1 represents the 1162 CBU per group monitored for 17 months. b) Follow-up 2 represents the 850 CBU per group monitored for 9 months. HLA analysis could only be performed at a low-resolution for HLA-A, -B and -DRB1 genes due to units of the control group were only typed at that level of resolution. The P-values for the Chi-Squared test are shown for each variable. HR indicates high-resolution; MT, maternal typing.

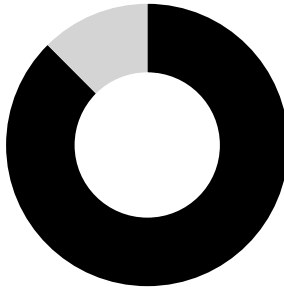
RESULTATS

1. Which group would you expect to be selected the most?



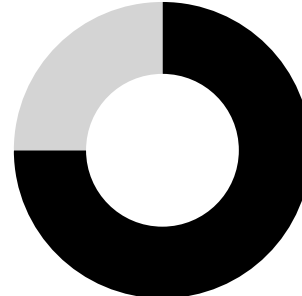
■ HR+MT
■ HR+MT and HR
■ Others^a

2. Do you think there is a global tendency to use a $\geq 5/8$ HR compatibility?



■ Yes
■ No

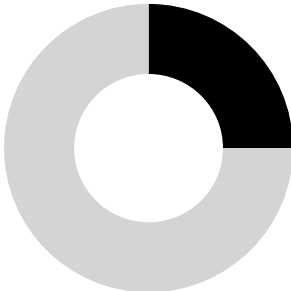
3. Would the presence of HR in donor registries favour its use?



■ Yes
■ No

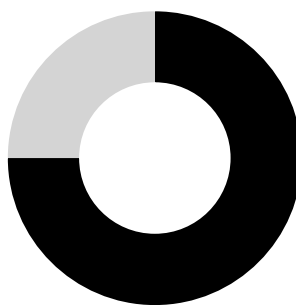
Units of the control group^b

4. Do you think that NIMA compatibility is used?



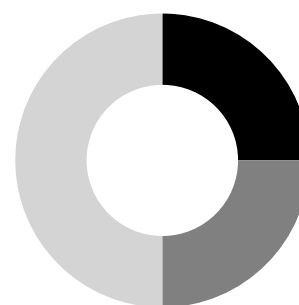
■ Yes
■ No

5. Would the presence of MT in donor registries favor its use?



■ Yes
■ No

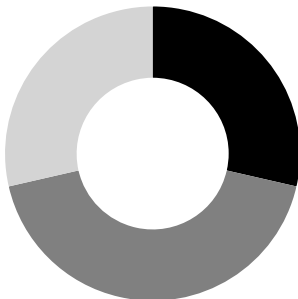
6. Which is the criterion you used to select the CBU?



■ Best cell content
■ Best HLA matching
■ Both

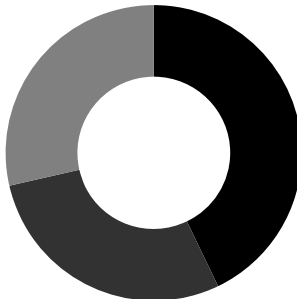
Units of the HR+MT and HR groups^c

7. The first time you received information of the CBU selected, did it contain HR (and MT)?



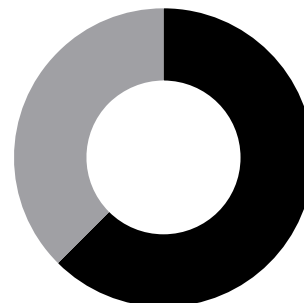
■ Yes
■ Only when PR was received
■ No

8. Did the presence of HR (and MT) in the registry influence your decision to select the CBU?



■ Yes, confidence
■ Yes, reduce transplant waiting time
■ Yes, compatibility
■ No

9. Do you think more stringent algorithms would make more difficult the search of a compatible CBU?



■ Yes
■ No

RESULTATS

Figure S9. Responses to questionnaires. Exact questions were: **1.** “Which study group would you expect to have a higher number of transplants?”; **2.** “Do you think there is a global tendency to select units with a high-resolution HLA-A, -B, -C, and -DRB1 compatibility with the receptor?”; **3.** “Do you think the selection of these units would be favoured if their high-resolution HLA information were more available in donor registries?”; **4.** “Do you think that NIMA compatibility is taken into account in the selection of cord blood units for transplantation?”; **5.** “Do you think that if maternal HLA information were more available in donor registries, NIMA compatibility would be considered more in the selection of cord blood units?”; **6.** “Which is the criterion you followed in order to select a cord blood unit typed according conventional recommendations instead of a high-resolution HLA typed unit?”; **7.** “The first time you received information of this cord blood unit, did it contain high-resolution HLA typing (and maternal HLA typing)?”; **8.** “Do you think that having the high-resolution HLA and maternal typing available in the registry influenced your decision to select this cord blood unit?”; **9.** “Do you think more stringent algorithms would make more difficult the search of a compatible cord blood unit?”. Number of transplant centers participating: 8. CBU indicates cord blood unit; HR, high-resolution; LR, low-resolution; MT, maternal typing; NIMA: non-inherited maternal antigens; PR, preliminary report.

^a Comments from transplant centers that answered “Others”: 1. Conventional HLA typing + MT; 2. Control group; 3. Less selected group: HR+MT.

^b Responses from transplant centers that selected units of the control group (n=4)

^c Responses from transplant centers that selected units of the HR+MT and HR group (n=7)

Supplementary tables

Table S1. CBUs characteristics

CBUs collection date:	
1999-2006	720 (9.60%)
2007-2010	3895 (51.93%)
2011-2014	2885 (38.47%)
Sex:	
Female	3697 (49.96%)
Male	3703 (50.04%)
ND	100
ABO Blood type:	
AB Negative	46 (0.61%)
AB Positive	230 (3.07%)
A Negative	507 (6.77%)
A Positive	2641 (35.26%)
B Negative	114 (1.52%)
B Positive	602 (8.04%)
O Negative	496 (6.62%)
O Positive	2855 (38.11%)
Ancestral origin:	
African	280 (4.15%)
European	5989 (88.75%)
Others	43 (0.64%)
South-American	436 (6.46%)
ND	752
TNC groups (x10E6):	
1250-1500	2915 (38.87%)
1500-2000	3505 (46.73%)
>2000	1080 (14,40%)
CD34 groups (x10E6):	
<5	3139 (41.85%)
5-10	3393 (45.24%)
>10	968 (12.91%)

CBU indicates cord blood unit; ND, not determined; TNC, total nucleated cell

RESULTATS

Table S2. CCR5, blood type, Rh and sex genotyping

	Genotype	N	Concordance (%)
CCR5-Δ32	HM	7	100%
	HT	32	100%
	WT	153	100%
ABO	AB	9	89%
	A	68	100%
	B	15	93%
	O	63	100%
Rh	Rh+	115	100%
	Rh-	40	100%
Sex	Female	78	99%
	Male	77	100%

HM indicates homozygous; HT, heterozygous; WT, wild-type

Table S3. Validation quality parameters

	RUN 1	RUN 2
Cluster density	1258 ± 24	893 ± 21
Cluster PF	75.69% ± 6.50	85.82% ± 4.16
Q30	75.03%	78.97%
Reads identified	92%	94.35%

PF indicates passing filter; Q30, Phred quality score of 30 (99.90% base call accuracy)

Article 3: HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies: An analysis of umbilical cord blood units at the Barcelona Cord Blood Bank

Emma Enrich, Eva Campos, Lluís Martorell, María José Herrero, Francisco Vidal, Sergi Querol, Francesc Rudilla

HLA. 2019 Jul.

DOI: 10.1111/tan.13644.

Resum

La compatibilitat HLA en alta resolució en el trasplantament de sang de cordó umbilical s'ha associat amb millors resultats de trasplantament i, en conseqüència, s'ha recomanat com a criteri de selecció. A més, altres aplicacions terapèutiques basades en cèl·lules derivades del cordó umbilical també requereixen una compatibilitat HLA entre la unitat de cordó i el receptor. En aquest sentit, la determinació de les freqüències dels gens HLA és de gran importància per tal de millorar la qualitat dels bancs de cordó. En aquest estudi s'han analitzat les freqüències al·lèliques dels gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, i *-DQB1* de 5.458 unitats de cordó umbilical d'elevada qualitat cel·lular. S'han identificat 275 al·lells de classe I i 121 al·lells de classe II, essent l'*A*02:01*, el *B*44:03*, el *C*07:01*, el *DRB1*07:01* i el *DQB1*03:01*, els que han tingut una major freqüència per cada locus analitzat. S'ha pogut determinar la presència o absència d'alguns al·lells nuls, com ara el *C*04:09N*, en una gran part de les unitats estudiades i, a més, s'han detectat 26 al·lells nous. Així mateix, la tipificació HLA materna en 1.877 d'aquestes unitats ha permès analitzar les freqüències haplotípiques reals i el desequilibri de lligament entre els diferents al·lells HLA. L'haplotip *A*29:02-B*44:03-C*16:01-DRB1*07:01-DQB1*02:02* ha resultat ser el més freqüent i les combinacions d'al·lells dels gens *HLA-DRB1* i *-DQB1* han presentat el major grau de desequilibri de lligament. Dels 11 haplotips identificats en les unitats homocigotes per tots els *loci* estudiats, 4 han coincidit amb els haplotips més freqüents, trobant-se en el 18% de la cohort analitzada. Aquest ha estat el primer estudi que reporta les freqüències al·lèliques i haplotípiques de les unitats de cordó del banc de cordó de Barcelona i és l'estudi més ampli realitzat fins al dia d'avui amb mostres del registre espanyol.

Article 4: Identification of the novel *HLA-B*57:91* allele, by next-generation sequencing in a Spanish individual.

Emma Enrich, Eva Campos, José Luís Caro-Oleas, María José Herrero-Mata, Francesc Rudilla

HLA. 2018 Jan;91(1):69-70

DOI: 10.1111/tan.13159

Resum

La implementació de la seqüenciació de nova generació en la tipificació dels gens HLA ha conferit certs avantatges, com són la possibilitat de seqüenciar de manera cost-eficient algunes regions que no s'analitzaven de forma rutinària amb les tècniques convencionals i la reducció de les ambigüitats de fase. Això ha permès que, en els últims anys, s'hagin reportat una gran quantitat d'al·lels nous a les bases de dades. En aquest article es descriu el *HLA-B*57:91*, un al·lel nou observat en la mare d'un donant de sang de cordó umbilical amb procedència Europea. Aquest al·lel s'ha detectat mitjançant una estratègia basada en la seqüenciació de nova generació, per a la seqüenciació dels exons 2, 3 i 4 dels gens HLA de classe I, i els exons 2 i 3 dels gens *HLA-DRB1* i *-DQB1*. Així mateix, per a la confirmació de la variant detectada, s'ha utilitzat una estratègia de tipificació basada en la seqüenciació per *Sanger*, així com una segona estratègia per a la seqüenciació dels gens sencers basada també en la seqüenciació de nova generació. Amb referència a l'al·lel *HLA-B*57:01:01*, el *B*57:91* presenta un canvi nucleotídic de citosina a adenina, a l'exó 4 i a la posició 1593 del gDNA, el que suposa un canvi d'aminoàcid d'asparagina a histidina (CAC → AAC). Aquest al·lel nou s'ha sotmès al GenBank (MF399459) i a la base de dades IPD-IMGT/HLA (HWS10029089).

Article 5: *HLA-DQB1*02:102*, a novel allele identified by next generation sequencing in a Spanish individual.

Emma Enrich, Laura Mongay, José Luis Caro-Oleas, María José Herrero-Mata, Francesc Rudilla

HLA. 2018 Feb;91(2):140-141

DOI: 10.1111/tan.13174

Resum

La implementació de la seqüenciació de nova generació als laboratoris d'histocompatibilitat per a la caracterització rutinària dels gens HLA, ha facilitat la seqüenciació a gran escala i, d'una manera cost-eficient, d'aquest complex grup de gens. En aquest article es descriu del *DQB1*02:102*, un al·lel nou identificat en la caracterització rutinària d'una mare d'un donant de sang de cordó umbilical d'origen europeu. Aquest al·lel s'ha detectat mitjançant una estratègia basada en la seqüenciació de nova generació, per a la seqüenciació dels exons 2, 3 i 4 dels gens HLA de classe I, i els exons 2 i 3 dels gens *HLA-DRB1* i *-DQB1*. Així mateix, per a la confirmació de la variant detectada, s'ha utilitzat una estratègia de tipificació basada en la seqüenciació per *Sanger*, així com una segona estratègia per a la seqüenciació dels gens sencers basada també en la seqüenciació de nova generació. Amb referència a l'al·lel *HLA-B*02:01:01*, el *DQB1*02:102* presenta un canvi nucleotídic d'adenina a guanina, a l'exó 3 i a la posició 4401 del gDNA, el que suposa un canvi d'aminoàcid d'asparagina a serina (AAC → AGC). Aquest al·lel nou s'ha sotmès al GenBank (MF461285) i a la base de dades IPD-IMGT/HLA (HWS10029197).

DISCUSSIÓ

El banc de sang de cordó umbilical de Barcelona és un dels sis bancs públics de l'Estat Espanyol i és un dels que disposa d'un major nombre d'unitats criopreservades, juntament amb el banc de cordó de Màlaga i el de Madrid.²³⁰ Des del seu inici l'any 1995, el nombre d'unitats del banc enviades a trasplantament va anar augmentant progressivament. D'acord amb la tendència global en l'ús de la UCB, l'any 2010 es va arribar al pic més alt d'unitats de cordó del banc trasplantades, amb un total de 236. Tot i això, a partir d'aleshores, l'ús de la UCB pel HSCT va començar a disminuir lleugerament a nivell global i, en conseqüència, també ho va fer el nombre d'unitats del banc sol·licitades per aquest procediment.

L'any 2014 es van iniciar els projectes que han donat lloc al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. En un moment en què l'ús de la UCB havia començat a disminuir, el propòsit del banc no era només seguir augmentant la diversitat de genotips disponibles, sinó també millorar la caracterització de les unitats de UCB que ja formaven part del seu inventari, per tal de fer-les més accessibles per aquells pacients que requerien un HSCT. El nombre de TNC que presenta una unitat de UCB, així com la compatibilitat HLA entre la unitat i el receptor, són els dos factors que han demostrat un major impacte en l'èxit del trasplantament de UCB. En conseqüència, el banc de cordó de Barcelona ha optat per ser cada vegada més estricte amb els criteris d'inclusió respecte al nombre de TNC de les unitats que s'hi criopreserven. Pel que fa a l'HLA, la major part de les unitats del banc que es trobaven disponibles l'any 2014 presentaven una tipificació HLA en una resolució baixa/intermèdia pels gens de classe I i només alta resolució pel gen *HLA-DRB1*. La publicació de diferents estudis que demostraven l'impacte favorable d'un major grau de compatibilitat HLA en els resultats del trasplantament de UCB, van posar de manifest la necessitat de millorar la caracterització HLA d'aquestes unitats. Així mateix, també va sorgir la necessitat de disposar d'inventaris d'unitats de UCB homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, per tal d'utilitzar-les en el tractament de pacients HIV⁺ que requerissin un HSCT. Aquesta proposta es fonamentava en el cas del pacient amb una infecció per HIV activa que, després de rebre un trasplantament hematopoètic d'un donant homozigot per aquesta deleció, no va mostrar evidències de la infecció.⁴⁸

D'acord amb això, la *Organización Nacional de Trasplantes* (ONT) va impulsar l'any 2014 un projecte per tal de determinar la presència del polimorfisme *CCR5-Δ32*, a les unitats de UCB del registre espanyol que presentaven una major quantitat de cèl·lules nucleades. Els criteris menys estrictes de compatibilitat HLA que permet el trasplantament de UCB en comparació amb les fonts adultes, així com la seva disponibilitat immediata, permetien

DISCUSSIÓ

proposar la UCB una bona opció terapèutica per aquest tipus de procediment.²⁰⁷ L'objectiu principal d'aquest projecte va ser, concretament: “disposar d'un inventari d'unitats homozigotes per la deleció, per tal de facilitar el desenvolupament d'estudis clínics en pacients amb una infecció per HIV que requerissin un HSCT”. Amb aquesta finalitat, es van dissenyar i desenvolupar dues estratègies basades en biologia molecular, per caracteritzar el polimorfisme *CCR5-Δ32* de manera cost-eficient. Gràcies al desenvolupament d'aquestes tècniques es van analitzar 8.538 unitats del banc amb $\geq 1,0 \times 10^9$ TNC, de les quals 54 (0,63%) van resultar ser homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*. A nivell espanyol, la tipificació de 20.236 unitats amb $\geq 1,0 \times 10^9$ TNC va permetre obtenir un inventari de 130 unitats homozigotes (0,64%). La freqüència al·lèlica del polimorfisme *CCR5-Δ32* obtinguda a nivell global va ser del 7,18%, similar a la descrita per a la població espanyola en altres estudis.^{45,46,231} A més, d'acord amb el reportat prèviament, es va observar una associació significativa entre l'origen ancestral dels donants de UCB i la presència del polimorfisme, essent major en aquells donants d'ascendència europea.

A partir de l'obtenció de l'inventari d'unitats *CCR5-Δ32*, es va iniciar un estudi exploratori assistencial amb l'objectiu de comprovar l'eficàcia del trasplantament amb unitats de UCB caracteritzades com a homozigotes per aquesta deleció, en l'erradicació del virus HIV en pacients que han desenvolupat una malaltia hematològica maligna. En aquest estudi hi participen l'Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda i l'Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, l'Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia, i l'Institut Català d'Oncologia de Barcelona. Tot i que les unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, caracteritzades en aquest estudi, es troben actualment disponibles per aquells pacients HIV⁺ que, a més, requereixin un HSCT, també poden ser utilitzades per pacients que necessitin un trasplantament però que no tinguin una infecció per HIV. No obstant això, en aquests casos, cal que se n'aprovi el seu ús per l'absència d'un altre donant compatible. Fins al moment en què s'ha finalitzat aquesta memòria, dues de les unitats *CCR5-Δ32* homozigotes, tipificades al Banc de Sang i Teixits, s'han pogut utilitzar per al trasplantament en pacients HIV⁺, tot i que encara no s'han fet públiques les dades sobre la seva evolució. Globalment, a part del cas del pacient de Berlín,⁴⁸ només s'ha publicat el cas d'un segon pacient que ha rebut un HSCT amb èxit d'un donant homozigot per la deleció *CCR5-Δ32*.⁵⁰ Tot i que encara és prematur poder concloure que s'ha aconseguit erradicar la infecció per HIV, fa poc més de 20 mesos que se li va discontinuar l'ART i el pacient no ha mostrat evidències de la infecció després del trasplantament. En ambdós casos, la font de HSC va provenir d'un donant adult no emparentat. Respecte a l'ús de UCB per a pacients HIV⁺, s'han descrit alguns casos en els quals s'han utilitzat unitats de UCB homozigotes per la

deleció *CCR5-Δ32*. Tot i això, la mort dels pacients per causes relacionades amb complicacions del trasplantament o per la malaltia hematològica de base, no ha permès fer un seguiment dels reservoris virals a llarg termini.^{51,52,208}

Un resultat inesperat, tot i que interessant, que se'n va derivar de l'anàlisi de les unitats *CCR5-Δ32*, va ser que les unitats caracteritzades com a homozigotes per aquesta deleció presentaven un nombre significativament menor de cèl·lules CD34⁺. Encara que és la primera vegada que es descriu aquesta observació i que, per tant, se'n desconeix el mecanisme d'acció, s'han reportat algunes evidències que expliquen el paper que podrien tenir el receptor CCR5 i els seus lligands en la capacitat de migració o proliferació de les cèl·lules CD34⁺ de la UCB. En primer lloc, el receptor CCR5 té un paper important en la migració i motilitat de les cèl·lules on s'expressa; així com en la seva activació, proliferació i supervivència.²³² A part d'expressar-se en limfòcits i macròfags, també s'ha observat la seva expressió en cèl·lules CD34⁺.²³³⁻²³⁵ A més, s'ha descrit que alguns tipus cel·lulars de la UCB expressen una major proporció de determinats receptors de citocines, com el CCR5, fet que explica les diferències fonamentals en la senyalització de quimiocines i la seva funció en aquest teixit i en l'ontogènia del sistema hematopoètic.²³⁶ En segon lloc, les cèl·lules CD34⁺, incloses les derivades de UCB, expressen els lligands CCL3, CCL4 i CCL5 del receptor CCR5.²³⁷ S'ha vist que aquests lligands poden modular la quimiotaxi i la capacitat d'adhesió de les cèl·lules CD34⁺ de la UCB i que el receptor CCR5 hi participa, encara que indirectament.²³³ Concretament, s'ha demostrat que modulen la capacitat quimiotàctica d'aquestes cèl·lules mitjançada per la quimiocina CXCL12 i el receptor CXCR4; i que inhibeixen la seva capacitat d'interaccionar amb la molècula d'adhesió VCAM-1, essent l'eix VLA-4 – VCAM-1 d'importància cabdal per la retenció de les HSC a la BM. Encara que no se'n coneix el motiu d'aquesta interacció, l'elevada expressió de les quimiocines CCL3, CCL4 i CCL5 en certes circumstàncies, com pot ser una situació d'inflamació, podria modular la capacitat de migració i mobilització de les HSC. Així mateix, tot i que existeixen algunes controvèrsies relacionades amb el seu efecte, s'ha reportat la capacitat del lligand CCL3, també anomenada proteïna inflamatori dels macròfags 1α (MIP-1α), d'inhibir la proliferació de les HSC més immadures, mantenint el *pool* de cèl·lules mare, a la vegada que indueix la proliferació i diferenciació de progenitors més madurs.²³⁸⁻²⁴¹ En darrer lloc, molts receptors de quimiocines poden tenir més d'un lligand diferent, i una mateixa quimiocina pot unir-se a diferents receptors, el que demostra la naturalesa redundat d'aquest sistema. Concretament, els lligands del CCR5 poden unir-se també als receptors CCR1, CCR2 i CCR3.⁴¹ Alguns autors han reportat que la manca d'expressió de *CCR5* pot causar un augment en l'expressió dels seus lligands, els quals poden actuar a

DISCUSSIÓ

través d'altres receptors de quimiocines. Aquests mecanismes compensatoris, probablement importants per mantenir les funcions immunitàries de defensa de l'organisme, poden provocar també efectes contraproductius que resultin en un dany a l'organisme.²⁴²⁻²⁴⁴ Tot això posa en evidència que l'acció dels lligands CCL3, CCL4 i CCL5, a través de la interacció amb el receptor CCR5 o, en la seva absència, amb altres receptors amb els quals hi tenen afinitat, podrien tenir un efecte sobre la capacitat quimiotàctica, de proliferació o supervivència de les cèl·lules CD34⁺. Seria de gran interès realitzar estudis en profunditat per poder explicar els resultats obtinguts, així com la seva implicació en el trasplantament hematopoètic. Així mateix, atès que el nombre d'unitats homozigotes obtingut en aquest estudi és limitat a causa de la baixa freqüència d'aquest polimorfisme, caldria també confirmar els resultats obtinguts en altres cohorts més extenses.

D'altra banda, també és important conèixer quines altres implicacions té la manca d'expressió del receptor CCR5 en l'organisme. Aparentment, els individus que presenten el polimorfisme *CCR5-Δ32* en homozigosi estan sans, probablement a causa de la redundància del sistema de quimiocines. No obstant això, en un estudi publicat aquest any, on s'ha analitzat l'efecte del polimorfisme *CCR5-Δ32* amb el risc de mortalitat en 409.693 individus del Biobanc del Regne Unit,²⁴⁵ s'ha observat que els individus que presenten el polimorfisme en homozigosi tenen una menor esperança de vida que els individus heterozigots o els que no presenten la deleció. Així mateix, diversos estudis han analitzat la implicació del polimorfisme *CCR5-Δ32* amb algunes malalties, majoritàriament relacionades amb el sistema immunitari. En alguns casos, la seva presència i, en conseqüència, l'absència del receptor CCR5, s'ha associat amb un pitjor pronòstic en malalties infeccioses, com és el cas de la infecció pel virus West Nile^{246,247} o pel virus de la grip,²⁴⁸ ja que en tots dos casos, el receptor CCR5 té un paper important en el control de la infecció mitjançant el reclutament de leucòcits. Per contra, en altres casos, el polimorfisme *CCR5-Δ32* s'ha associat amb un efecte protector, com ara després d'un vessament cerebral²⁴⁹ o en la diabetis tipus1,^{250,251} ja que en aquests casos l'acció del receptor CCR5 agreuja el desenvolupament de la malaltia. Tot i això, també hi ha alguns estudis que mostren resultats discrepants en relació amb la implicació del polimorfisme *CCR5-Δ32* amb algunes malalties. Aquestes diferències podrien ser causades per la complexitat de les malalties estudiades, per la interacció d'altres factors genètics i per la diversitat en l'origen geogràfic de les cohorts estudiades.²³² Determinar quins són els efectes de l'absència d'expressió d'aquest receptor és d'importància cabdal per conèixer i sospesar les conseqüències de bloquejar la seva acció, ja sigui a través d'un

trasplantament hematopoètic, de fàrmacs inhibidors o de l'edició genètica, així com per saber com prevenir els possibles efectes adversos que se'n puguin derivar.

Tot i això, els dos casos de pacients que han pogut fer front a una malaltia hematològica i, probablement també, a la infecció pel HIV gràcies al trasplantament hematopoètic, donen suport a la utilització d'aquest tipus de procediment per aquesta finalitat. És per això que també és important seguir incrementant l'inventari d'unitats de UCB i de donants adults homozigots pel polimorfisme *CCR5-Δ32*. En aquest sentit, es requereix una col·laboració internacional per tal de diversificar els genotips HLA disponibles en els inventaris *CCR5-Δ32*. D'aquesta manera s'augmentarà la probabilitat que qualsevol pacient que ho requereixi pugui trobar un donant o una unitat que presenti la deleció en homozigosi i que sigui histocompatible. Han sorgit iniciatives en aquesta direcció, com la de *StemCyte International Cord Blood Center*, que va obtenir un inventari de més de 200 unitats de UCB homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32* després de tipificar unes 25.000 unitats del mateix banc i d'altres bancs col·laboradors.²⁰⁷ De la mateixa manera, els laboratoris d'histocompatibilitat més importants han optat per incloure la determinació d'aquest polimorfisme en la caracterització rutinària dels donants adults.⁴⁶ En el cas del Banc de Sang i Teixits, es va incloure la determinació del polimorfisme *CCR5-Δ32* en la caracterització rutinària de totes les unitats de cordó a partir de l'any 2016. Això va ser possible, ja que l'any anterior, el laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del Banc de Sang i Teixits va validar i implementar una estratègia de tipificació HLA basada en la NGS, desenvolupada pel Laboratori de Coagulopaties Congènites. Conjuntament amb la caracterització dels gens HLA, aquesta estratègia també va ser dissenyada per a la determinació del polimorfisme *CCR5-Δ32*.

El laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del Banc de Sang i Teixits s'encarrega de la tipificació HLA de tots els hospitals de l'Institut Català de la Salut, de donants de BM del Registre de Donants de Medul·la Òssia (REDMO) i del banc de cordó de Barcelona. L'elevada càrrega assistencial del laboratori, la necessitat d'obtenir una tipificació HLA de bona qualitat i la introducció de la tecnologia NGS al banc, van conduir al disseny d'estratègies de tipificació HLA basades en aquesta tecnologia. En aquest sentit, la seva implementació al laboratori ha permès no només realitzar una tipificació HLA en alta resolució d'una manera cost-eficient, sinó també reduir de forma considerable les ambigüitats trobades amb les tècniques clàssiques i incrementar el nombre de gens caracteritzats simultàniament sense augmentar els costos. De forma paral·lela, la tecnologia NGS s'ha introduït en molts laboratoris d'histocompatibilitat d'arreu del món.

DISCUSSIÓ

Això ha implicat un increment considerable del nombre d'al·lels nous reportats a la base de dades IPD-IMGT/HLA, quintuplicant-se en els últims 10 anys.² A més, també s'ha pogut completar la seqüència de molts al·lels que presentaven una seqüència incompleta a la base de dades. Actualment, diferents empreses com GenDX, One Lambda i Omixon comercialitzen *kits* de seqüenciació dels gens HLA basats en la NGS. Tanmateix, alguns laboratoris, com el Banc de Sang i Teixits, han optat per dissenyar les seves pròpies estratègies de tipificació HLA. Alguns d'aquests procediments descrits es basen en la seqüenciació dels gens complets,^{19,23,28-30} mentre que d'altres es limiten a la seqüenciació dels exons més polimòrfics.²⁵⁻²⁷

La primera estratègia que es va desenvolupar al laboratori, implementada l'any 2015, es basa en la seqüenciació completa dels gens HLA. L'evolució d'aquesta estratègia ha permès, actualment, la seqüenciació simultània dels gens complets *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, *-DQA1*, *-DPB1* i *-DPA1*, així com de les regions gèniques que permeten la determinació del grup sanguini ABO, el Rh, el sexe i el polimorfisme *CCR5-Δ32*. La seqüenciació completa dels gens HLA és una estratègia molt informativa, ja que ofereix una tipificació més precisa i permet reduir les ambigüitats, el que és de gran importància en el moment de seleccionar un donant compatible per un pacient que requereix un trasplantament hematopoètic. Tot i que aquestes estratègies basades amb la NGS són més rentables que les que utilitzen les tecnologies convencionals, els costos de seqüenciar tots els gens complets són majors que quan es limita la seqüenciació a les regions exòniques. El motiu és que les tecnologies NGS no poden seqüenciar fragments de la mida d'un gen complet, sinó que aquests han d'estar al voltant de 35-700 parells de bases, el que comporta la necessitat de realitzar procediments de fragmentació del DNA.²² En canvi, les estratègies que es limiten a la seqüenciació dels exons més polimòrfics, generen fragments més petits que poden ser seqüenciats sense procediments addicionals. Aquestes estratègies, tot i que no són tan informatives i presenten resultats amb més ambigüitats, són més adequades per a la seqüenciació d'un gran volum de mostres de manera cost-eficient, com ara donants voluntaris de BM i unitats de UCB.

Tal com s'ha introduït prèviament, a partir del 2016, totes les noves unitats de UCB que s'incorporaven al banc es tipificaven amb aquesta nova estratègia basada en la seqüenciació dels gens complets. No obstant això, la majoria de les unitats criopreservades al banc en aquell moment presentaven una tipificació HLA en baixa/intermèdia resolució pels gens de classe I i només en alta resolució pel gen *DRB1*. Per aquest motiu, d'acord amb els estudis que demostraven uns millors resultats de trasplantament de UCB amb una

DISCUSSIÓ

compatibilitat en alta resolució en els gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1*, es va optar per millorar de forma retrospectiva la caracterització HLA de les unitats del banc. Per a aquest propòsit, es va dissenyar una segona estratègia basada en la NGS, però de més baix cost, per seqüenciar els exons més polimòrfics dels gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1*. Tot i que el gen *HLA-DQB1* no s'ha associat amb millors resultats després del trasplantament de UCB, la finalitat de dissenyar aquesta estratègia no va ser només per implementar-la en la tipificació retrospectiva de les unitats de UCB del banc, sinó també en la tipificació rutinària de donants adults de BM. Així mateix, aquesta estratègia també inclou la caracterització del grup sanguini ABO, el Rh, el sexe i el polimorfisme *CCR5-Δ32*.

La validació d'aquesta tècnica en 768 mostres va resultar en un 99% de concordança, el que va permetre la seva implementació en la rutina clínica del laboratori. Posteriorment a la seva validació, s'han realitzat contínues millores tècniques que, juntament amb les actualitzacions dels programes d'anàlisi, han permès incrementar, encara més, la qualitat de la tipificació HLA. D'entrada, s'han modificat les proporcions d'alguns encebadors i se n'han dissenyat de nous, per tal de disminuir els desequilibris de cobertura entre diferents al·lels HLA observats durant la validació. En aquest sentit, s'ha aconseguit, entre d'altres, augmentar la cobertura de l'al·lel *HLA-C*02:10* i de l'antigen *DQB1*03*, així com disminuir la cobertura dels antigens *DRB1*04* i **07*. També, s'han dissenyat encebadors fora de les regions d'interès per identificar la presència dels al·lels nuls que es troben a les ambigüitats més freqüents, com ara el *HLA-C*04:09N*. Tot i que segueixen havent-hi alguns al·lels nuls que no poden ser identificats amb aquesta estratègia, cap d'ells s'ha pogut detectar en els més de 15.000 donants voluntaris seqüenciats al laboratori amb l'altra estratègia de tipificació HLA basada en la seqüenciació dels gens complets, el que demostra la baixa freqüència en la qual apareixen aquests al·lels. D'altra banda, en les darreres versions, també s'ha incorporat la tipificació del gen *HLA-DPB1*, i s'han millorat les condicions de PCR per reduir el soroll de fons i facilitar l'anàlisi bioinformàtic.

Malgrat que d'entrada és una estratègia similar a la PCR-SBT, ja que es basa en la seqüenciació dels exons 2, 3 i 4 dels gens de classe I, i dels exons 2 i 3 dels gens de classe II, presenta una sèrie d'avantatges respecte a aquesta. En primer lloc, s'ha aconseguit una reducció considerable de les ambigüitats *cis/trans*. Això és gràcies a la tecnologia NGS, que a diferència de la seqüenciació de Sanger, és capaç de seqüenciar de manera independent els fragments que provenen de dos cromosomes diferents. En segon lloc, aquesta estratègia és molt més econòmica que la tècnica de seqüenciació per Sanger utilitzada al laboratori. A part del seu disseny intern, tots els gens d'interès, és a dir, els

DISCUSSIÓ

gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1*, així com els gens que permeten la determinació del grup sanguini ABO, el Rh, el sexe i el polimorfisme *CCR5-Δ32*, són amplificats en una única PCR per individu. En tercer lloc, la seva automatització, juntament amb la possibilitat de seqüenciar fins a 384 mostres de forma simultània, ha permès assumir volums de treball més grans i reduir els temps de resposta del laboratori. En aquest sentit, els bons resultats obtinguts amb les dues estratègies desenvolupades internament per a la tipificació HLA, ha conduït al Banc de Sang i Teixits a llicenciar la tecnologia per a la seva futura comercialització.

Un cop validada, aquesta estratègia es va implementar per a millorar la caracterització HLA de les unitats de UCB de millor qualitat del banc, essent les mateixes que havien estat prèviament caracteritzades pel polimorfisme *CCR5-Δ32*. En total, es van tipificar els gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* en alta resolució en més de 5.000 unitats de UCB i més de 2.500 mostres maternes associades a aquestes unitats, el que ha permès augmentar la qualitat de l'inventari de cordons del banc, així com del REDMO. Actualment, el banc disposa d'aproximadament 10.000 unitats de UCB que presenten $\geq 1,25 \times 10^9$ TNC, de les quals el 52% presenta una tipificació en alta resolució de tots aquests gens. Pel que fa a la caracterització del HLA matern, atès que només es realitza de rutina al banc com a mètode confirmatori quan una unitat de UCB és seleccionada pel trasplantament, només un 1% de les unitats presentava tipificació HLA materna abans d'iniciar aquest projecte. Actualment, un 14% de les unitats del banc presenten aquesta informació. Tal com s'ha reportat en alguns estudis, la tipificació del HLA matern i, per tant, la determinació dels NIMA permet augmentar el nombre de genotips virtuals disponibles que presenta un banc, el que incrementa la probabilitat de trobar una unitat compatible per un pacient que requereixi un trasplantament.

Amb la implementació d'aquesta estratègia no només s'ha reduït el nombre d'ambigüitats i s'ha augmentat el grau de resolució de la tipificació HLA de les unitats de UCB del banc, sinó que també s'han pogut descriure al·lels nous i determinar alguns al·lels nuls. En total, durant la tipificació de les unitats de UCB, es van identificar 21 al·lels que no havien estat descrits prèviament. La substitució nucleotídica va resultar en 14 d'ells en un canvi d'aminoàcid, afectant l'estructura proteica dels dominis extracel·lulars de la molècula HLA; mentre que en 2 d'ells, el canvi d'aminoàcid va donar lloc a un codó de parada. L'aparició d'un codó de parada prematur podria resultar en la formació d'una molècula HLA incompleta o en un al·lel que no s'acaba expressant. La caracterització dels al·lels nuls és de gran importància en el HSCT, ja que no poder-los detectar correctament pot resultar en

una resposta al·loreactiva inesperada i, en conseqüència, induir GVHD o rebuig de l'empelt.²⁵² És per aquest motiu que es va millorar l'estratègia desenvolupada per a poder detectar alguns dels al·lels nuls més freqüents, dels quals l'al·lel C*04:09N es va trobar en un 0,14% de les mostres tipificades.

Disposar d'una cohort de més de 5.000 donants sans caracteritzats pels gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* en alta resolució, així com les seves respectives mostres maternes, ha fet possible realitzar un estudi de freqüències al·lèliques i haplotípiques. Aquest estudi és representatiu de les freqüències HLA del banc de cordó de Barcelona, però també de la nostra regió, ja que és el primer estudi de freqüències realitzat en una cohort tan gran de població espanyola. Actualment, s'està tramitant l'enviament d'aquestes freqüències al *Allele Frequencies Net Database*, una base de dades que disposa de freqüències determinades arreu del món dels gens més polimòrfics del genoma humà.²⁵³ L'anàlisi de les freqüències al·lèliques i haplotípiques dels gens HLA poden ser útils per estudis antropològics i de genètica de poblacions, per conèixer els fluxos genètics i l'evolució poblacional. Així mateix, es poden utilitzar per a crear algorismes de cerca de donants o per programes d'anàlisi que es basen en freqüències HLA descrites prèviament, com són els mateixos programes bioinformàtics per a la tipificació HLA, així com per disposar d'una població control per a fer estudis d'associació d'al·lels HLA amb la predisposició o protecció a desenvolupar una malaltia. A nivell del Laboratori d'Histocompatibilitat i Immunogenètica del Banc de Sang i Teixits, aquest estudi ha permès disposar d'unes freqüències control de la nostra regió, les quals poden ser utilitzades com a suport durant l'anàlisi bioinformàtic de la tipificació HLA. Com a exemple, l'estudi de desequilibri de lligament, realitzat a partir de freqüències haplotípiques reals, pot servir d'ajuda per conèixer quines són les associacions esperades més freqüents entre els gens *HLA-DQB1* i *-DRB1*, i detectar la presència de possibles desequilibris entre al·lels. Finalment, aquests estudis poden ajudar a conèixer la disponibilitat de genotips HLA als registres de donants, a saber quins són els més representats i quins són els que requereixen esforços addicionals per a la seva ampliació. D'aquesta manera es pot focalitzar la recollida de donants voluntaris o unitats de UCB en aquelles poblacions menys representades, optimitzant així els inventaris i, en el cas de la UCB, els costos associats al seu manteniment en els bancs de cordó umbilical.

La determinació dels haplotips HLA més freqüents ha permès realitzar una estimació del nombre de genotips HLA únics que serien necessaris per representar una hipotètica cohort de pacients de la nostra regió. El Banc de Sang i Teixits està treballant actualment en un projecte per crear un banc d'unitats de UCB homozigotes pels haplotips HLA més

DISCUSSIÓ

freqüents, amb l'objectiu de produir iPSC per a futures aplicacions en medicina regenerativa. La importància de disposar d'unitats de UCB homozigotes rau en el fet que només cal buscar compatibilitat HLA a nivell d'un sol haplotip entre la unitat de UCB i el pacient. En el nostre cas, vam trobar que només els quatre haplotips més freqüents identificats en unitats homozigotes, es trobaven representats en el 18% de la cohort. En aquest sentit, la tipificació HLA d'una part important de l'inventari d'unitats de UCB del banc, així com la realització d'un estudi de les seves freqüències al·lèliques i haplotípiques, no només és important per la seva utilització com a font de HSC pel trasplantament, sinó també per totes aquelles aplicacions futures que requereixin un cert grau de compatibilitat HLA.

D'altra banda, la tipificació d'aquest gran nombre d'unitats de UCB i de mostres maternes va permetre també avaluar l'impacte de la tipificació HLA en alta resolució de les unitats de UCB, així com la determinació dels NIMA, en la selecció de la UCB pel trasplantament. Amb motiu dels estudis realitzats i de les conseqüents recomanacions d'utilitzar una compatibilitat $\geq 5/8$ considerant els gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1* en alta resolució, la nostra hipòtesi inicial era que la tipificació HLA en alta resolució de les unitats de UCB tindria un impacte positiu en la seva selecció pel trasplantament. D'altra banda, atès que encara es recomana seguir estudiant la contribució de la compatibilitat NIMA en estudis prospectius abans de considerar-la com a criteri de selecció de la UCB i que, a més, la determinació dels NIMA en els registres de donants és escassa, no esperàvem trobar encara un impacte significatiu de la tipificació materna, encara que probablement sí a més llarg termini, si aquesta hipòtesi acaba confirmant-se.

Durant els mesos de seguiment, les unitats de UCB que presentaven tipificació HLA en alta resolució i tipificació materna van mostrar una tendència contínua a ser les més seleccionades pel trasplantament. Tot i que la tipificació HLA materna no va ser utilitzada per buscar una compatibilitat NIMA amb el pacient, disposar d'aquesta informació, juntament amb la tipificació HLA de la unitat en alta resolució en el moment de la selecció del cordó, podria haver conferit certs avantatges. Una major confiança en la unitat de UCB pel fet de disposar d'una tipificació HLA en alta resolució i la verificació del seu genotip amb l'haplotip matern, així com una reducció en el temps d'espera entre la selecció de la unitat i el seu trasplantament, en podrien ser alguns. Pel que fa als centres de trasplantament que van participar en els qüestionaris, tots van reportar que la presència de tipificació HLA en alta resolució de les unitats de cordó, així com la tipificació HLA materna, va influenciar la seva decisió a l'hora de seleccionar aquella unitat, bé per a una major confiança amb la

unitat o bé per una reducció del temps d'espera. D'acord amb això, vam observar que el temps transcorregut entre l'enviament de l'informe preliminar al centre de trasplantament i, finalment, l'enviament de la unitat per a ser trasplantada, va ser menor en el grup de cordons que presentaven alta resolució i tipificació materna. Malgrat que les diferències no van ser significatives, possiblement a causa d'una mida mostral petita, la mitjana de dies d'espera per aquest grup va ser de 24 dies. En canvi, en el grup d'unitats amb alta resolució va ser de 28 dies i en el grup control de 34. És important tenir en compte que altres factors no relacionats amb la unitat de UCB, sinó amb l'evolució i l'estat del pacient, també poden influenciar aquest temps d'espera. Tot i això, atès que la disponibilitat immediata és un dels avantatges de la UCB i que aquesta font de HSC s'utilitza en molts casos com a opció alternativa quan no s'ha trobat un donant familiar o un donant no emparentat compatible, la disminució del temps d'espera podria haver influenciat la selecció d'unitats d'aquest grup.

Tot i la major tendència a seleccionar unitats amb alta resolució i tipificació materna, no es van trobar diferències estadísticament significatives entre els tres grups d'estudi. És per aquest motiu, que no s'ha pogut demostrar, encara, l'impacte de les variables analitzades en la selecció de la UCB pel trasplantament. Diverses raons podrien explicar els resultats observats en aquest estudi. D'entrada, podria ser que l'alta resolució encara no sigui un criteri ben establert de manera global per a la selecció de la UCB pel trasplantament. D'acord amb això, la meitat dels centres de trasplantament que van respondre els qüestionaris van reportar que, de forma habitual, consideren una compatibilitat $\geq 5/8$ en alta resolució en els gens *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1*, mentre que l'altra meitat va reportar seguir considerant els criteris convencionals. Pel que fa a la utilització de la compatibilitat NIMA, tots els centres de trasplantament que van participar en els qüestionaris, van respondre no tenir-la en compte per a la selecció de la UCB.

D'altra banda, en el moment de seleccionar les unitats de UCB pel trasplantament, els registres de donants de cada país hi tenen un paper important, ja que no són directament els centres de trasplantament qui fan les cerques de donants. En conseqüència, la informació inicial que reben els clínics per a poder fer la selecció pot estar incompleta. Per exemple, el REDMO envia als clínics un llistat amb les unitats que han complert els criteris de selecció, el qual no inclou informació de la tipificació HLA materna. D'aquest llistat, els clínics fan una segona selecció i sol·liciten l'informe preliminar. Arran d'aquest estudi, es va sol·licitar a REDMO que aquest informe preliminar inclogués la informació HLA materna, pel que des de principis de 2018 ja hi està incorporada. Tot i això, cada país i cada registre té la seva normativa específica, el que dificulta conèixer si els clínics han pogut accedir a

DISCUSSIÓ

tota la informació dels cordons del banc a l'hora de seleccionar-los pel trasplantament. Considerant les respostes dels qüestionaris, només alguns clínics van reportar haver rebut la informació HLA completa de la unitat, així com la informació materna, en el primer moment que van disposar de les dades d'aquella unitat. En aquest sentit, seria de gran importància que, tant els criteris de selecció de les unitats pel trasplantament basats en evidències científiques, com la manera en la qual aquesta informació es transmet als clínics, estigués més consensuada i fos més homogènia globalment.

En últim terme, el context actual en què es troba el trasplantament de UCB també podria explicar els resultats observats en aquest estudi. Espanya és el tercer país del món i el primer d'Europa pel que fa al nombre d'unitats de UCB criopreservades. Actualment disposa de més de 64.500 unitats disponibles, distribuïdes entre els diferents bancs espanyols. Una part molt important de les donacions espanyoles de HSC per a pacients estrangers correspon a unitats de UCB (**Figura 12**). De les 3.022 donacions que s'han realitzat fins al 2018, 2.483 (82%) corresponen a unitats de UCB, mentre que la resta són donacions de BM o sang perifèrica mobilitzada. Tot i això, des del 2010, s'observa una caiguda progressiva de les donacions de UCB. Pel que fa als pacients espanyols que han rebut un trasplantament de UCB, també s'ha observat aquesta disminució gradual (**Figura 13**).^{230,254} D'acord amb això, els trasplantaments realitzats a partir d'unitats de UCB del banc de cordó de Barcelona també ha anat disminuint en els últims anys, de manera que durant el període d'estudi (gener 2018-maig 2019) només 93 unitats del banc van ser seleccionades pel trasplantament. És possible que el baix nombre de trasplantaments realitzats amb unitats del banc hagi dificultat evidenciar l'impacte de les variables estudiades en la selecció de la UCB pel trasplantament. A més, el fet d'utilitzar la UCB com a font alternativa en absència d'altres donants compatibles, pot contribuir a disposar d'un ventall d'unitats compatibles amb el pacient més limitat, el que dificulta tenir l'opció de prioritzar aquelles unitats que presenten l'alta resolució o la informació materna. És per aquestes raons, que caldrà mantenir el seguiment dels tres grups d'estudi per tal d'analitzar la seva evolució a llarg termini.

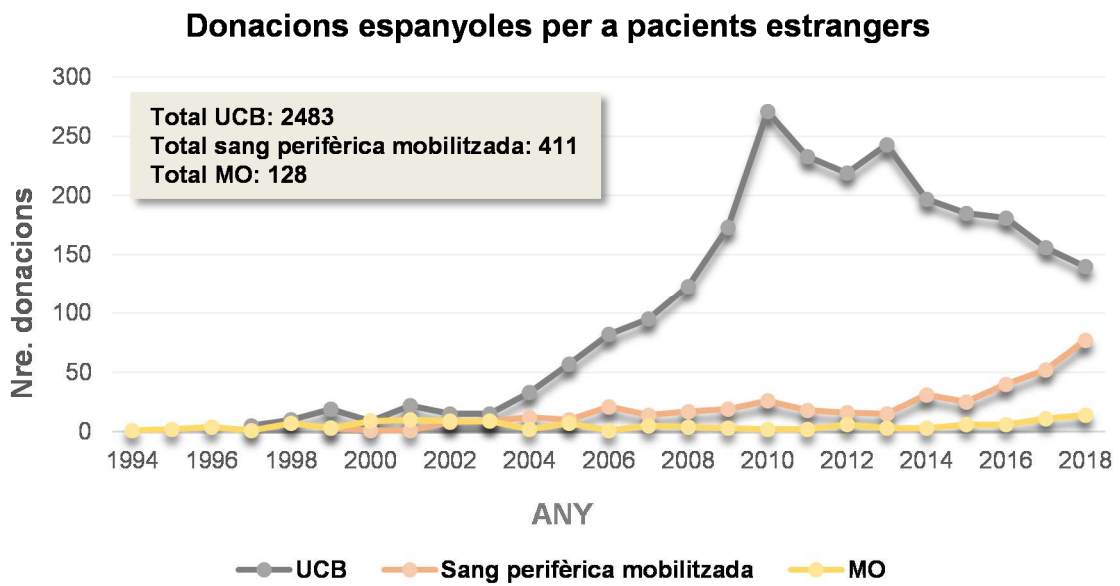


Figura 12. Evolució de les donacions de HSC espanyoles per a pacients estrangers. Font: adaptada de la “Memoria de actividad donación de progenitores hematopoyéticos, España 2018” , de la *Organización Nacional de Trasplantes*.²³⁰

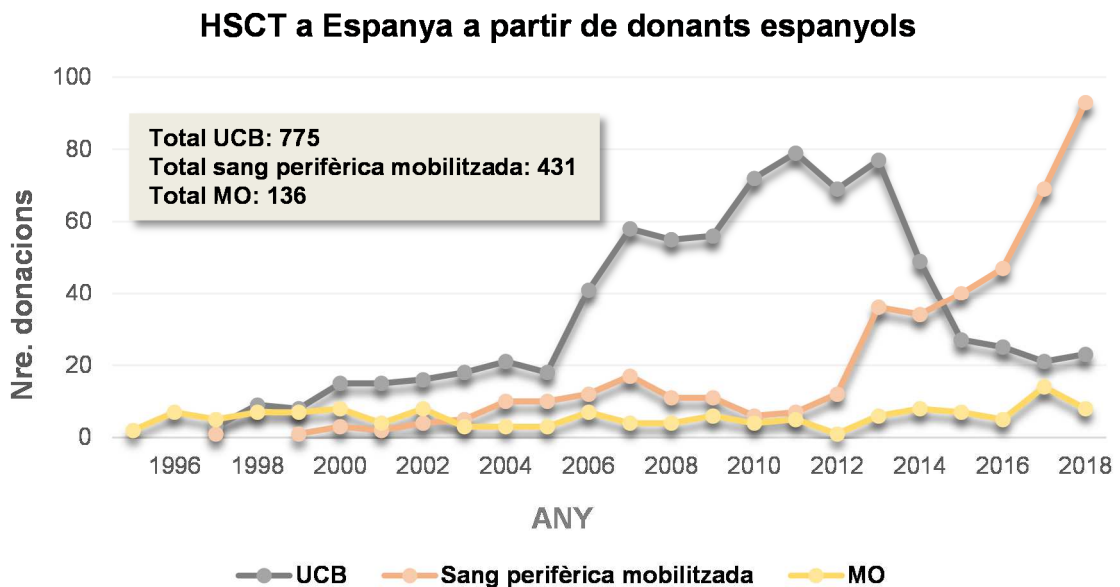


Figura 13. Evolució dels HSCT realitzats a Espanya a partir de donants espanyols. Font: adaptada de la “Memoria de actividad donación de progenitores hematopoyéticos, España 2018” , de la *Organización Nacional de Trasplantes*.²³⁰

DISCUSSIÓ

Una de les raons que pot explicar la disminució en la utilització de la UCB pel HSCT és l'increment dels trasplantaments haploidèntics. Totes dues estratègies s'han considerat com a fonts alternatives quan no hi ha disponible un familiar o un donant adult compatible. En els últims anys, però, han sorgit noves modalitats en el trasplantament haploidèntic, basades en la depleció de cèl·lules T, la utilització de règims de condicionament particulars o l'administració de ciclofosfamida posttrasplantament, que li han conferit uns bons resultats i que expliquen el seu increment.²²⁷ D'altra banda, les complicacions després del trasplantament de UCB causades per una recuperació immunitària lenta i un major risc d'infeccions, juntament amb totes les conseqüències clíniques i econòmiques que d'això se'n deriven, han limitat estendre el seu ús àmpliament, sobretot en pacients adults. Tot i això, la UCB ha demostrat uns resultats a llarg termini després del trasplantament comparables amb els de les fonts adultes, així com una potent resposta antileucèmica. A més, els resultats del trasplantament de UCB han anat millorant en els últims anys, probablement a causa d'una optimització en els criteris d'inclusió de les unitats als bancs de cordó i als criteris de selecció de les unitats pel trasplantament. Així mateix, la millora en les mesures de profilaxis, seguiment i tractament de les infeccions, així com en el condicionament, també hi han tingut un paper important. Pel que fa a l'ús d'ATG, alguns estudis han demostrat que té un impacte negatiu en la recuperació hematopoètica després del trasplantament de UCB, pel que s'ha proposat ajustar la seva dosi segons les característiques del pacient. S'ha observat, també, que el centre de trasplantament té un efecte important, ja que els centres més experimentats han demostrat tenir uns resultats de supervivència després del trasplantament de UCB superiors.^{166,255} En conjunt, la seva utilització durant gairebé tres dècades ha permès conèixer les peculiaritats d'aquesta font de progenitors tan valuosa, així com guanyar experiència per saber com encarar les seves limitacions. Actualment existeixen un gran ventall d'opcions a l'hora d'escollir un donant per un HSCT, de manera que la probabilitat de poder tenir un donant per a qualsevol pacient que requereix un HSC és, avui en dia, molt major. En aquest context, cada font de HSC hi té el seu lloc, en funció de les necessitats clíniques del pacient i dels avantatges que cada una d'elles pot oferir. És per tot això, que cal seguir treballant per tal d'optimitzar els resultats del trasplantament de UCB, per a poder treure el màxim rendiment del seu potencial hematopoètic. En aquest sentit, és de cabdal importància 1) optimitzar la seva recollida a les maternitats i prioritzar la inclusió als bancs de cordó de les unitats de millor qualitat, 2) seleccionar unitats de bancs de cordó acreditats que segueixin els estàndards internacionals de processament de la UCB, 3) disposar d'uns criteris de selecció ben establerts i homogenis de manera global basats en les evidències clíniques, 4) facilitar la

DISCUSSIÓ

utilització d'aquests criteris a través d'augmentar la disponibilitat de la informació de les unitats de UCB als registres de donants i la seva accessibilitat als clínics, 5) realitzar la infusió de les unitats en centres experimentats en aquest tipus de trasplantament i 6) adaptar l'ús de l'ATG segons les necessitats d'aquesta font de HSC. En relació amb els punts 3 i 4, la majoria de centres de trasplantament que van respondre els qüestionaris van reportar la necessitat de tenir en compte la compatibilitat HLA en alta resolució i, alguns d'ells, també la compatibilitat NIMA en el trasplantament de UCB, així com de poder disposar d'aquesta informació als registres de donants. És per tot això que el banc de cordó de Barcelona segueix apostant per millorar la caracterització de les unitats criopreservades i, actualment, no només s'està realitzant la tipificació en alta resolució de totes les unitats noves que arriben al banc, sinó també de les 2.500 unitats de UCB utilitzades com a grup control en aquest estudi. La tipificació en alta resolució d'aquestes unitats s'incorporarà al registre espanyol un cop es valori aturar de forma definitiva el seguiment dels tres grups d'estudi. En darrer lloc, també és de gran importància seguir treballant per tal de millorar la capacitat d'empelt de les HSC de la UCB, amb l'objectiu de reduir el risc d'infeccions i els costos associats al trasplantament de cordó. En els últims anys, s'ha demostrat que la infusió de HSC de cordó expandides *ex vivo* ha tingut un impacte positiu en el seu empelt. Tot i que el seu ús terapèutic encara és limitat, la millora en els coneixements sobre la capacitat de proliferació i autorenovació de les HSC de la UCB, així com el desenvolupament de noves aproximacions per la seva expansió, permetran que aquesta pràctica sigui més assequible en els pròxims anys.¹⁴⁸

En resum, durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha millorat considerablement la caracterització de les unitats de UCB de més bona qualitat cel·lular del programa Concordia, mitjançant l'obtenció d'un inventari d'unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32* i la tipificació en alta resolució els gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* en més de 5.000 unitats de UCB i més de 2.500 mostres maternes. Tot això facilitarà la utilització de la UCB per pacients HIV⁺ que requereixin un HSCT, la utilització de la compatibilitat HLA segons les recomanacions actuals i la realització d'estudis prospectius per avaluar l'efecte de la compatibilitat NIMA. En aquest sentit, esperem que la millora de la caracterització de les unitats del banc faciliti l'accés a la teràpia a molts malalts que no troben un donant compatible adequat, i a la vegada augmentar el seu èxit terapèutic. La implementació de la tecnologia NGS al banc ha tingut un paper cabdal en el desenvolupament d'aquest projecte, ja que ha estat possible dissenyar una estratègia de molt baix cost que, a part de la tipificació HLA, també inclou la caracterització del polimorfisme *CCR5-Δ32*. En darrer lloc, disposar d'una cohort considerablement gran de

DISCUSSIÓ

donants sans tipificats per HLA, així com de familiars d'aquests donants, ha fet possible poder realitzar un estudi de freqüències al·lèliques i haplotípiques HLA, no només representativa del banc de cordó de Barcelona, sinó també de part de la població espanyola.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La caracterització de més de 8.000 unitats de UCB del banc ha permès la identificació de 54 unitats homozigotes pel polimorfisme *CCR5-Δ32*, les quals formen part de l'inventari de 130 unitats homozigotes obtingut a nivell espanyol, disponibles per aquelles pacients HIV⁺ que requereixin un HSCT.
2. Les unitats homozigotes per la deleció *CCR5-Δ32* presenten un nombre significativament menor de cèl·lules CD34⁺. Són necessaris estudis futurs per poder explicar els resultats obtinguts i determinar-ne les possibles implicacions en el trasplantament hematopoètic.
3. La seqüenciació de 672 ha permès validar amb més d'un 99% de concordança una estratègia de molt baix cost, basada en la NGS, per a la tipificació simultània dels gens *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* i *-DQB1* en alta resolució, i per la determinació del polimorfisme *CCR5-Δ32*.
5. La tipificació de més de 5.000 unitats de UCB i més 2.500 mostres maternes ha permès millorar la caracterització de l'inventari del banc de cordó de Barcelona, de manera que, actualment, més d'un 40% de les unitats presenten una tipificació HLA en alta resolució i més d'un 13% presenten la determinació dels NIMAs.
6. La implementació de l'estratègia desenvolupada en la tipificació extensiva d'unitats de UCB i mostres maternes, ha permès realitzar el primer estudi de freqüències al·lèliques i haplotípiques dels gens HLA en alta resolució del banc de cordó de Barcelona, i el més extens realitzat fins al dia d'avui en població espanyola.
7. Tot i una major tendència a seleccionar les unitats amb tipificació HLA en alta resolució i tipificació materna, no hi ha hagut un impacte significatiu d'aquestes variables en la selecció preferent de la UCB pel trasplantament. Els resultats d'aquest estudi posen en evidència la necessitat d'establir globalment els criteris de selecció de la UCB, d'incrementar la presència d'aquesta informació als registres de donants i la seva accessibilitat als clínics.

BIBLIOGRAFIA

1. Horton, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 889–899 (2004).
2. Robinson, J. *et al.* The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* **43**, D423–D431 (2015).
3. Trowsdale, J. & Knight, J. C. Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 301–323 (2013).
4. Owen, J., Punt, J. & Stranford, S. *Kuby. Immunology.* (Mc Graw Hill Education, 2013).
5. Socie, G. & Blazar, B. R. Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation* (Elsevier, 2013).
6. Malfroy, L. *et al.* Heterogeneity in Rates of Recombination in the 6-Mb Region Telomeric to the Human Major Histocompatibility Complex. *Genomics* **43**, 226–231 (1997).
7. Mungall, A. J. *et al.* The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* **425**, 805–811 (2003).
8. Bochtler, W. *et al.* World Marrow Donor Association framework for the implementation of HLA matching programs in hematopoietic stem cell donor registries and cord blood banks. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 338–343 (2011).
9. Lie, B. A. & Thorsby, E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 526–531 (2005).
10. Mallal, S. *et al.* Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* **359**, 727–732 (2002).
11. Bharadwaj, M. *et al.* Drug Hypersensitivity and Human Leukocyte Antigens of the Major Histocompatibility Complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 401–431 (2012).
12. D’Orsogna, L. J., Roelen, D. L., Doxiadis, I. I. N. & Claas, F. H. J. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics* **64**, 77–85 (2012).
13. Spierings, E. & Fleischhauer, K. Histocompatibility. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 61–68 (Springer, 2019).
14. Afzali, B., Lechler, R. I. & Hernandez-Fuentes, M. P. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* **69**, 545–556 (2007).
15. Petersdorf, E. W. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 588–593 (2008).
16. Nowak, J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* **42**, S71–S76 (2008).

17. Marsh, S. G. E. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* **75**, 291–455 (2010).
18. Nunes, E. *et al.* Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood* **118**, e180–e183 (2011).
19. Erlich, H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* **80**, 1–11 (2012).
20. Dunn, P. P. J. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *Int. J. Immunogenet.* **38**, 463–473 (2011).
21. De Santis, D. *et al.* 16 th IHIW : Review of HLA typing by NGS. *Int. J. Immunogenet.* **40**, 72–76 (2013).
22. Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 333–351 (2016).
23. Gabriel, C. *et al.* HLA typing by next-generation sequencing - getting closer to reality. *Tissue Antigens* **83**, 65–75 (2014).
24. Hosomichi, K., Shiina, T., Tajima, A. & Inoue, I. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *J. Hum. Genet.* **60**, 665–673 (2015).
25. Lange, V. *et al.* Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* **15**, 63 (2014).
26. Danzer, M. *et al.* Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: a transition from research to diagnostics. *BMC Genomics* **14**, 221 (2013).
27. Trachtenberg, E. A. & Holcomb, C. L. Next-generation HLA sequencing using the 454 GS FLX system. *Methods Mol. Biol.* **1034**, 197-219 (2013)
28. Ehrenberg, P. K. *et al.* High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics* **15**, 864 (2014).
29. Ozaki, Y. *et al.* Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics* **16**, 318 (2015).
30. Mayor, N. P. *et al.* HLA Typing for the Next Generation. *PLoS One* **10**, e0127153 (2015).
31. Profaizer, T. & Kumánovics, A. Human Leukocyte Antigen Typing by Next-Generation Sequencing. *Clin. Lab. Med.* **38**, 565–578 (2018).
32. World Health Organization. World Health Organization. (2019). Available at: <https://www.who.int/hiv/>. (Accessed: 27th August 2019)
33. Finzi, D. *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**, 512–517 (1999).
34. Vidya Vijayan, K. K., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P. & Hanna, L. E. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
35. Dalgleish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763–767 (1984).

36. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* (80-). **272**, 872–877 (1996).
37. Cocchi, F. *et al.* Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. *Science* (80-). **270**, 1811–1815 (1995).
38. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661–666 (1996).
39. Weiss, R. A. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. *BMC Biol.* **11**, 57 (2013).
40. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1–Infected Individuals. *J. Exp. Med.* **185**, 621–628 (1997).
41. Bachelierie, F. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **66**, 1–79 (2014).
42. Liu, R. *et al.* Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* **86**, 367–377 (1996).
43. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE . *Science* **273**, 1856–62 (1996).
44. Mulherin, S. A. *et al.* Effects of CCR5-Δ32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression. *AIDS* **17**, 377–387 (2003).
45. Martinson, J. J., Chapman, N. H., Rees, D. C., Liu, Y.-T. & Clegg, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet.* **16**, 100–103 (1997).
46. Solloch, U. V. *et al.* Frequencies of gene variant CCR5-Δ32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Hum. Immunol.* **78**, 710–717 (2017).
47. Gonzalez, G. *et al.* Identification and frequency of CCR5Δ32/Δ32 HIV-resistant cord blood units from Houston area hospitals. *HIV Med.* **12**, 481–486 (2011).
48. Hütter, G. *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 692–698 (2009).
49. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 32/ 32 stem cell transplantation. *Blood* **117**, 2791–2799 (2011).
50. Gupta, R. K. *et al.* HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* **568**, 244–248 (2019).
51. Hütter, G. More on Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32/Delta32 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2437–2438 (2014).
52. Rothenberger, M. *et al.* Transplantation of CCR5Δ32 Homozygous Umbilical Cord Blood in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia and Perinatally Acquired HIV Infection. *Open Forum Infect. Dis.* **5**, (2018).

53. Kordelas, L., Verheyen, J. & Esser, S. Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **371**, 880–882 (2014).
54. Verheyen, J. *et al.* Rapid Rebound of a Preexisting CXCR4-tropic Human Immunodeficiency Virus Variant After Allogeneic Transplantation With CCR5 Δ 32 Homozygous Stem Cells. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 684–687 (2019).
55. Henrich, T. J. *et al.* Antiretroviral-Free HIV-1 Remission and Viral Rebound After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Ann. Intern. Med.* **161**, 319 (2014).
56. Cummins, N. W. *et al.* Extensive virologic and immunologic characterization in an HIV-infected individual following allogeneic stem cell transplant and analytic cessation of antiretroviral therapy: A case study. *PLOS Med.* **14**, e1002461 (2017).
57. Salgado, M. *et al.* Mechanisms That Contribute to a Profound Reduction of the HIV-1 Reservoir After Allogeneic Stem Cell Transplant. *Ann. Intern. Med.* **169**, 674 (2018).
58. Aiuti, A., Scala, S. & Chabannon, C. Biological Properties of HSC: Scientific Basis for HSCT. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 49–56 (Springer, 2019).
59. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
60. Mikkola, H. K. A. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–3744 (2006).
61. Carreras, F. J. Fundació Josep Carreras. (2019). Available at: <https://www.fcarreras.org/>. (Accessed: 27th August 2019)
62. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).
63. Gatti, R., Meuwissen, H., Allen, H., Hong, R. & Good, R. IMMUNOLOGICAL RECONSTITUTION OF SEX-LINKED LYMPHOPENIC IMMUNOLOGICAL DEFICIENCY. *Lancet* **292**, 1366–1369 (1968).
64. Rainer, S. HSCT: Historical Perspective. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 3–10 (Springer, 2019).
65. Evseeva, I., Foeken, L. & Madrigal, A. The Role of Unrelated Donor Registries in HSCT. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 19–26 (Springer, 2019).
66. WMDA. World Marrow Donor Association. (2019). Available at: <https://wmda.info>. (Accessed: 27th August 2019)
67. Gragert, L. *et al.* HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N. Engl. J. Med.* **371**, 339–348 (2014).
68. Ayuk, F. & Balduzzi, A. Donor selection for adults and pediatrics. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 87–97 (Springer, 2019).
69. Nagler, A. & Shimoni, A. Conditioning. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 107–116 (Springer, 2019).

- N.) 99–108 (Springer, 2019).
70. Ciurea, S. O. *et al.* Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **21**, 1392–1398 (2015).
 71. Shaw, B. E. *et al.* Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **24**, 1049–1056 (2018).
 72. Wang, Y. *et al.* Donor and recipient age, gender and ABO incompatibility regardless of donor source: validated criteria for donor selection for haematopoietic transplants. *Leukemia* **32**, 492–498 (2018).
 73. Holler, E., Greinix, H. & Zeiser, R. Acute graft-versus-host disease. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 323–330 (Springer, 2019).
 74. Villa, N., Rahman, M., McFadden, G. & Cogle, C. Therapeutics for Graft-versus-Host Disease: From Conventional Therapies to Novel Virotherapeutic Strategies. *Viruses* **8**, 85 (2016).
 75. Wolff, D. & LawitSchka, A. Chronic graft-versus-host disease. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 331–346 (2019).
 76. Cooke, K. R. *et al.* The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 211–234 (2017).
 77. Grube, M. *et al.* Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation—Results from a Single-Center Observational Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 1781–1791 (2016).
 78. Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y. & Huang, X.-J. Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 79. Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y. & Huang, X.-J. Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 80. Wang, Y. & Zhao, S. *Vascular Biology of the Placenta.* (Morgan & Claypool Publishers, 2010).
 81. Knudtzon, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* **43**, 357–61 (1974).
 82. Nakahata, T. & Ogawa, M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J. Clin. Invest.* **70**, 1324–1328 (1982).
 83. Migliaccio, G. *et al.* Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac---liver transition. *J. Clin. Invest.* **78**, 51–60 (1986).
 84. Broxmeyer, H. E. *et al.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4109–13 (1992).

85. Broxmeyer, H. E. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3828–3832 (1989).
86. Gluckman, E. *et al.* Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1174–1178 (1989).
87. Broxmeyer, H. E. *et al.* Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem and Repopulating Cells in Human Clinical Transplantation. *Blood Cells* **17**, 313-329 (1991).
88. Kohli-Kumar, M. *et al.* Haemopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. *Br. J. Haematol.* **85**, 419–422 (1993).
89. Wagner, J. E. *et al.* Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* **79**, 1874–81 (1992).
90. &NA. HLA-MISMATCHED CORD-BLOOD TRANSPLANTATION IN A PATIENT WITH ADVANCED LEUKEMIA. *Transplantation* **53**, 1155–1156 (1992).
91. Vowels, M. R. *et al.* Correction of X-Linked Lymphoproliferative Disease by Transplantation of Cord-Blood Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1623–1625 (1993).
92. &NA; UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION IN A PATIENT WITH PHILADELPHIA CHROMOSOME-POSITIVE CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. *Transplantation* **56**, 477–478 (1993).
93. Issaragrisil, S. *et al.* Transplantation of Cord-Blood Stem Cells into a Patient with Severe Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* **332**, 367–369 (1995).
94. Wagner, J., Steinbuch, M., Kernan, N., Broxmeyer, H. & Gluckman, E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* **346**, 214–219 (1995).
95. Cardoso, A. A. *et al.* Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8707–11 (1993).
96. Banking on Umbilical Cords. *Science (80-)*. **257**, 615–615 (1992).
97. Rubinstein, P., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W. & Stevens, C. E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* **81**, 1679–90 (1993).
98. Gluckman, E. *et al.* Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation: an international cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant.* **11**, 199–200 (1993).
99. Rubinstein, P. *et al.* Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* **20**, 587–96; discussion 596-600 (1994).
100. McCullough, J. *et al.* Proposed policies and procedures for the establishment of a cord blood bank. *Blood Cells* **20**, 609-626(1994).
101. Gluckman, E. European organization for cord blood banking. in *Blood Cells* **20**, 601-8 (1994).
102. Rubinstein, P. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10119–10122 (1995).

103. Eurocord. Eurocord. (2015). Available at: <http://www.eurocord.org>. (Accessed: 29th August 2019)
104. FACT. The Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy. (2014). Available at: <http://www.factwebsite.org/>. (Accessed: 29th August 2019)
105. Rubinstein, P. *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1565–77 (1998).
106. Gluckman, E. *et al.* Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. *N. Engl. J. Med.* **337**, 373–381 (1997).
107. Rocha, V. *et al.* Transplants of Umbilical-Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Acute Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2276–2285 (2004).
108. Querol, S. & Vanderson, R. Procurement and management of cord blood. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 131–136 (Springer, 2019).
109. Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. & Loken, M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**, 1218–27 (1991).
110. Carow, C. E., Hangoc, G. & Broxmeyer, H. E. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* **81**, 942–9 (1993).
111. Hows, J. M. *et al.* Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures. *Lancet* **340**, 73–76 (1992).
112. Lu, L., Xiao, M., Shen, R. N., Grigsby, S. & Broxmeyer, H. E. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* **81**, 41–8 (1993).
113. GORDON, M. Y., LEWIS, J. L., SCOTT, M. A., ROBERTS, I. A. G. & GOLDMAN, J. M. Probability of progenitor renewal (PPR) and production of clonogenic progeny (CFU-GM) by primitive adherent progenitor cells in adult human bone marrow and umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **90**, 744–749 (1995).
114. Harris, D. T. *et al.* Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10006–10 (1992).
115. D'Arena, G. *et al.* Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* **83**, 197–203 (1998).
116. Griffiths-Chu, S., Patterson, J. A., Berger, C. L., Edelson, R. L. & Chu, A. C. Characterization of immature T cell subpopulations in neonatal blood. *Blood* **64**, 296–300 (1984).
117. Foa, R., Giubellino, M. C., Fierro, M. T., Lusso, P. & Ferrando, M. L. Immature T lymphocytes in human cord blood identified by monoclonal antibodies: A model for the study of the differentiation pathway of T cells in humans. *Cell. Immunol.* **89**, 194–201 (1984).
118. Risdon, G., Gaddy, J. & Broxmeyer, H. E. Allogeneic responses of human umbilical cord blood. in *Blood Cells* **20**, 566-70 (1994).

119. Risdon, G., Gaddy, J., Stehman, F. B. & Broxmeyer, H. E. Proliferative and Cytotoxic Responses of Human Cord Blood T Lymphocytes Following Allogeneic Stimulation. *Cell. Immunol.* **154**, 14–24 (1994).
120. Risdon, G., Gaddy, J., Horie, M. & Broxmeyer, H. E. Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2413–2417 (1995).
121. Takahata, Y. *et al.* CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp. Hematol.* **32**, 622–629 (2004).
122. Godfrey, W. R. Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* **105**, 750–758 (2005).
123. Lee, C.-C., Lin, S.-J., Cheng, P.-J. & Kuo, M.-L. The regulatory function of umbilical cord blood CD4 + CD25 + T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous interleukin (IL)-2 or IL-15. *Pediatr. Allergy Immunol.* **20**, 624–632 (2009).
124. Sorg, R. V, Kögler, G. & Wernet, P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* **93**, 2302–7 (1999).
125. Borrás, F. E., Matthews, N. C., Lowdell, M. W. & Navarrete, C. V. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br. J. Haematol.* **113**, 925–931 (2001).
126. Liu, E., Tu, W., Law, H. K. W. & Lau, Y.-L. Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br. J. Haematol.* **113**, 240–246 (2001).
127. Drohan, L. *et al.* Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets. *Hum. Immunol.* **65**, 1356–1369 (2004).
128. LANGRISH, C. L., BUDDLE, J. C., THRASHER, A. J. & GOLDBLATT, D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 118–123 (2002).
129. Goriely, S. *et al.* Deficient IL-12(p35) Gene Expression by Dendritic Cells Derived from Neonatal Monocytes. *J. Immunol.* **166**, 2141–2146 (2001).
130. Verneris, M. R. & Miller, J. S. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br. J. Haematol.* **147**, 185–191 (2009).
131. GADDY, J., RISDON, G. & BROXMEYER, H. E. Cord Blood Natural Killer Cells Are Functionally and Phenotypically Immature but Readily Respond to Interleukin-2 and Interleukin-12. *J. Interf. Cytokine Res.* **15**, 527–536 (1995).
132. Dalle, J.-H. *et al.* Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections. *Pediatr. Res.* **57**, 649–655 (2005).
133. Luevano, M. *et al.* The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation. *Hum. Immunol.* **73**, 248–257 (2012).
134. Rocha, V. Umbilical cord blood cells from unrelated donor as an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation in children and adults. *Semin. Hematol.* **53**, 237–245 (2016).

135. Migliaccio, A. R. & Papayannopoulou, T. Cord blood hematopoiesis: the road to transplantation. in *Cord blood stem cells medicine* (eds. Stavropoulos-Giokas, C., Charron, D. & Navarrete, C.) 27–37 (Elsevier, 2015).
136. Mayani, H. & Lansdorf, P. M. Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells* **16**, 153–165 (1998).
137. Politikos, I. & Boussiotis, V. A. The role of the thymus in T-cell immune reconstitution after umbilical cord blood transplantation. *Blood* **124**, 3201–3211 (2014).
138. Storek, J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 583–597 (2008).
139. Terakura, S. *et al.* Hematopoietic Engraftment in Recipients of Unrelated Donor Umbilical Cord Blood Is Affected by the CD34+ and CD8+ Cell Doses. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 822–830 (2007).
140. Keever-Taylor, C. *et al.* Factors affecting neutrophil and platelet reconstitution following T cell-depleted bone marrow transplantation: differential effects of growth factor type and role of CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 791–800 (2001).
141. Lucchini, G., Perales, M.-A. & Veys, P. Immune reconstitution after cord blood transplantation: peculiarities, clinical implications and management strategies. *Cytotherapy* **17**, 711–722 (2015).
142. Servais, S., Hannon, M., Peffault de Latour, R., Socie, G. & Beguin, Y. Reconstitution of adaptive immunity after umbilical cord blood transplantation: impact on infectious complications. *Stem Cell Investig.* **4**, 40–40 (2017).
143. Chiesa, R. *et al.* Omission of in vivo T-cell depletion promotes rapid expansion of naïve CD4+ cord blood lymphocytes and restores adaptive immunity within 2 months after unrelated cord blood transplant. *Br. J. Haematol.* **156**, 656–666 (2012).
144. Krenger, W. & Holländer, G. A. The immunopathology of thymic GVHD. *Semin. Immunopathol.* **30**, 439–456 (2008).
145. Klein, A. K. *et al.* T-cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 454–466 (2001).
146. Talvensaari, K. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* **99**, 1458–1464 (2002).
147. Mehta, R. S., Dave, H., Bollard, C. M. & Shpall, E. J. Engineering cord blood to improve engraftment after cord blood transplant. *Stem Cell Investig.* **4**, 41 (2017).
148. Mayani, H., Wagner, J. E. & Broxmeyer, H. E. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, challenges, and perspectives. *Bone Marrow Transplant.* (2019).
149. Ballen, K. K. *et al.* Double Unrelated Reduced-Intensity Umbilical Cord Blood Transplantation in Adults. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 82–89 (2007).
150. Barker, J. N. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* **105**, 1343–1347 (2004).

151. Wang, L. *et al.* Single- Versus Double-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Hematologic Diseases: A Systematic Review. *Transfus. Med. Rev.* **33**, 51–60 (2019).
152. van Besien, K. & Childs, R. Haploidentical cord transplantation—The best of both worlds. *Semin. Hematol.* **53**, 257–266 (2016).
153. Kwon, M. *et al.* Haplo-Cord transplantation compared to haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide in patients with AML. *Bone Marrow Transplant.* **52**, 1138–1143 (2017).
154. van Besien, K. *et al.* Cord blood chimerism and relapse after haplo-cord transplantation. *Leuk. Lymphoma* **58**, 288–297 (2017).
155. Sanz, J. *et al.* Single umbilical cord blood with or without CD34+ cells from a third-party donor in adults with leukemia. *Blood Adv.* **1**, 1047–1055 (2017).
156. Barker, J. N. *et al.* Double-Unit Cord Blood (CB) Transplantation Combined with Haplo-Identical CD34+ Cells Results in 100% CB Engraftment with Enhanced Myeloid Recovery. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, S138–S139 (2014).
157. Mehta, R. S., Dave, H., Bollard, C. M. & Shpall, E. J. Engineering cord blood to improve engraftment after cord blood transplant. *Stem Cell Investig.* **4**, 41–41 (2017).
158. Frassoni, F. *et al.* Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* **9**, 831–839 (2008).
159. Frassoni, F. *et al.* The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 237–244 (2010).
160. Rocha, V. *et al.* Unrelated Cord Blood Transplantation. *Transplant. J.* **95**, 1284–1291 (2013).
161. Murata, M. *et al.* Phase II study of intrabone single unit cord blood transplantation for hematological malignancies. *Cancer Sci.* **108**, 1634–1639 (2017).
162. Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* **21**, 1387–1394 (2007).
163. de Koning, C., Admiraal, R., Nierkens, S. & Boelens, J. J. Immune reconstitution and outcomes after conditioning with anti-thymocyte-globulin in unrelated cord blood transplantation; the good, the bad, and the ugly. *Stem Cell Investig.* **4**, 38–38 (2017).
164. Lindemans, C. A. *et al.* Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood* **123**, 126–132 (2014).
165. Castillo, N. *et al.* Early and Long-Term Impaired T Lymphocyte Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation with Antithymocyte Globulin. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 491–497 (2017).
166. de Koning, C., Admiraal, R., Nierkens, S. & Boelens, J. J. Immune reconstitution and outcomes after conditioning with anti-thymocyte-globulin in unrelated cord blood transplantation; the good, the bad, and the ugly. *Stem Cell Investig.* **4**, 38–38 (2017).
167. Admiraal, R. *et al.* Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol.* **2**, e194–e203 (2015).

168. Castillo, N. *et al.* Early and Long-Term Impaired T Lymphocyte Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation with Antithymocyte Globulin. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 491–497 (2017).
169. Hanley, P. J. *et al.* Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* **114**, 1958–1967 (2009).
170. Hanley, P. J., Bollard, C. M. & Brunstein, C. G. Adoptive immunotherapy with the use of regulatory T cells and virus-specific T cells derived from cord blood. *Cytotherapy* **17**, 749–755 (2015).
171. Micklethwaite, K. P. *et al.* Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood* **115**, 2695–2703 (2010).
172. Brunstein, C. G. *et al.* Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* **127**, 1044–1051 (2016).
173. Delaney, M. & Ballen, K. K. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 179–187 (2010).
174. Kim, Y.-J. & Broxmeyer, H. E. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **79**, 112–26 (2011).
175. Chen, L., Cohen, A. C. & Lewis, D. B. Impaired Allogeneic Activation and T-helper 1 Differentiation of Human Cord Blood Naive CD4 T Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 160–171 (2006).
176. Milano, F., Appelbaum, F. R. & Delaney, C. Cord-Blood Transplantation in Patients with Minimal Residual Disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2203–2205 (2016).
177. Hiwarkar, P. *et al.* Cord blood T cells mediate enhanced antitumor effects compared with adult peripheral blood T cells. *Blood* **126**, 2882–2891 (2015).
178. Zheng, C.-C. *et al.* Clinical separation of cGvHD and GvL and better GvHD-free/relapse-free survival (GRFS) after unrelated cord blood transplantation for AML. *Bone Marrow Transplant.* **52**, 88–94 (2017).
179. Eapen, M. *et al.* Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* **369**, 1947–1954 (2007).
180. Barker, J. N., Scaradavou, A. & Stevens, C. E. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood* **115**, 1843–1849 (2010).
181. Rocha, V., Gluckman, E. & Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant group. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br. J. Haematol.* **147**, 262–74 (2009).
182. Petersdorf, E. W. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* **122**, 1863–1872 (2013).
183. Fleischhauer, K. & Shaw, B. E. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood* **130**, 1089–1096 (2017).

184. Ruggeri, A., Paviglianiti, A., Gluckman, E. & Rocha, V. Impact of HLA in cord blood transplantation outcomes. *HLA* **87**, 413–421 (2016).
185. Eapen, M. *et al.* Effect of donor–recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **12**, 1214–1221 (2011).
186. Sanz, J. *et al.* Impact on Outcomes of Human Leukocyte Antigen Matching by Allele-Level Typing in Adults with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 106–110 (2014).
187. Brunstein, C. G. *et al.* Impact of Allele-Level HLA Mismatch on Outcomes in Recipients of Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 487–492 (2016).
188. Eapen, M. *et al.* Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood* **123**, 133–140 (2014).
189. Hough, R. *et al.* Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: an update on cord blood unit selection, donor selection algorithms and conditioning protocols. *Br. J. Haematol.* **172**, 360–370 (2016).
190. Eapen, M. *et al.* Allele-level HLA matching for umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases in children: a retrospective analysis. *Lancet Haematol.* **4**, e325–e333 (2017).
191. Oran, B. *et al.* Better allele-level matching improves transplant-related mortality after double cord blood transplantation. *Haematologica* **100**, 1361–1370 (2015).
192. Mallhi, K. K. *et al.* Allele-Level HLA Matching Impacts Key Outcomes Following Umbilical Cord Blood Transplantation for Inherited Metabolic Disorders. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 119–125 (2017).
193. Takanashi, M. *et al.* The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood* **116**, 2839–2846 (2010).
194. Cutler, C. *et al.* Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation. *Blood* **118**, 6691–6697 (2011).
195. Ruggeri, A. *et al.* Impact of donor-specific anti-HLA antibodies on graft failure and survival after reduced intensity conditioning-unrelated cord blood transplantation: a Eurocord, Societe Francophone d'Histocompatibilite et d'Immunogenetique (SFHI) and Societe Francaise de. *Haematologica* **98**, 1154–1160 (2013).
196. Dutta, P. & Burlingham, W. J. Microchimerism. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**, 359–365 (2011).
197. Eikmans, M. *et al.* Naturally acquired microchimerism. *Chimerism* **5**, 24–39 (2014).
198. Mold, J. E. *et al.* Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science (80-.).* **322**, 1562–1565 (2008).
199. Burlingham, W. J. *et al.* The Effect of Tolerance to Noninherited Maternal HLA Antigens on the Survival of Renal Transplants From Sibling Donors. *N Engl J Med.* **340**, 1369–70 (1999).

200. van Rood, J. J. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood* **99**, 1572–1577 (2002).
201. Ichinohe, T. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood* **104**, 3821–3828 (2004).
202. van Rood, J. J. *et al.* Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19952–19957 (2009).
203. Rocha, V. *et al.* Effect of HLA-Matching Recipients to Donor Noninherited Maternal Antigens on Outcomes after Mismatched Umbilical Cord Blood Transplantation for Hematologic Malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 1890–1896 (2012).
204. Van der Zanden, H. G. M. *et al.* Noninherited Maternal Antigens Identify Acceptable HLA Mismatches: Benefit to Patients and Cost-Effectiveness for Cord Blood Banks. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1791–1795 (2014).
205. Powley, L. *et al.* Consideration of noninherited maternal Ags as permissible HLA mismatches in cord blood donor selection. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 675–679 (2016).
206. Kwok, J. *et al.* Simulation of non-inherited maternal antigens acceptable HLA mismatches to increase the chance of matched cord blood units: Hong Kong's experience. *Hum. Immunol.* **79**, 539–544 (2018).
207. Petz, L. D. *et al.* Hematopoietic Cell Transplantation with Cord Blood for Cure of HIV Infections. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **19**, 393–397 (2013).
208. Duarte, R. F. *et al.* CCR5 Δ 32 homozygous cord blood allogeneic transplantation in a patient with HIV: a case report. *Lancet HIV* **2**, e236–e242 (2015).
209. Petz, L. D. *et al.* Progress toward curing HIV infection with hematopoietic cell transplantation. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* **8**, 109–16 (2015).
210. Romee, R. *et al.* Impact of ABO-mismatch on risk of GVHD after umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 1046–1049 (2013).
211. Kudek, M. R. *et al.* Impact of Graft–Recipient ABO Compatibility on Outcomes after Umbilical Cord Blood Transplant for Nonmalignant Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 2019–2024 (2016).
212. Wang, W. *et al.* Chromosome Y–encoded antigens associate with acute graft-versus-host disease in sex-mismatched stem cell transplant. *Blood Adv.* **2**, 2419–2429 (2018).
213. Popli, R., Sahaf, B., Nakasone, H., Lee, J. Y. Y. & Miklos, D. B. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol. Res.* **58**, 249–258 (2014).
214. Baron, F. *et al.* Unrelated cord blood transplantation for adult patients with acute myeloid leukemia: higher incidence of acute graft-versus-host disease and lower survival in male patients transplanted with female unrelated cord blood—a report from Eurocord, the Acute Le. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 107 (2015).
215. Willemze, R. *et al.* KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* **23**, 492–500 (2009).

216. Brunstein, C. G. *et al.* Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* **113**, 5628–5634 (2009).
217. Garfall, A. *et al.* KIR ligand incompatibility is not associated with relapse reduction after double umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 1000–1002 (2013).
218. Tanaka, J. *et al.* Effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* **3**, e164–e164 (2013).
219. van Rood, J. J., Scaradavou, A. & Stevens, C. E. Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a graft-versus-leukemia effect in cord blood transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2509–2514 (2012).
220. Barker, J. N. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* **97**, 2957–2961 (2001).
221. Brunstein, C. G. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* **116**, 4693–4699 (2010).
222. Atsuta, Y. *et al.* Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 780–787 (2012).
223. Lou, X., Zhao, C. & Chen, H. Unrelated donor umbilical cord blood transplant versus unrelated hematopoietic stem cell transplant in patients with acute leukemia: A meta-analysis and systematic review. *Blood Rev.* **32**, 192–202 (2018).
224. Keating, A. K. *et al.* The influence of stem cell source on transplant outcomes for pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **3**, 1118–1128 (2019).
225. Passweg, J. R. *et al.* Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant.* **50**, 476–482 (2015).
226. Passweg, J. R. *et al.* Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant.* **52**, 811–817 (2017).
227. Liu, J. H., Kanakry, C. G. & Luznik, L. Have haploidentical transplants replaced umbilical cord transplants for acute leukemias? *Curr. Opin. Hematol.* **25**, 103–111 (2018).
228. Ciceri, F., Bacigalupo, A., Lankester, A. & Bertaina, A. Haploidentical HSCT. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 479–486 (Springer, 2019).
229. Damien, P. & Allan, D. S. Regenerative Therapy and Immune Modulation Using Umbilical Cord Blood-Derived Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **21**, 1545–1554 (2015).
230. REDMO-ONT. Organización Nacional de Trasplantes. *Memoria de actividad de donación de progenitores hematopoyéticos, España 2018* (2018).
231. LUCOTTE, G. Frequencies of 32 base pair deletion of the (Δ 32) allele of the CCR5 HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. *Infect. Genet. Evol.* **1**, 201–205 (2002).

232. Ghorban, K. *et al.* Is the CCR5 Δ 32 Mutation Associated with Immune System-Related Diseases? *Inflammation* **36**, 633–642 (2013).
233. Basu, S. & Broxmeyer, H. E. CCR5 Ligands Modulate CXCL12-Induced Chemotaxis, Adhesion, and Akt Phosphorylation of Human Cord Blood CD34⁺ Cells. *J. Immunol.* **183**, 7478–7488 (2009).
234. Shen, H. *et al.* Intrinsic human immunodeficiency virus type 1 resistance of hematopoietic stem cells despite coreceptor expression. *J. Virol.* **73**, 728–37 (1999).
235. Ruiz, M. E. *et al.* Peripheral blood-derived CD34⁺ progenitor cells: CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV. *J. Immunol.* **161**, 4169–76 (1998).
236. Rosu-Myles, M. *et al.* Characterization of Chemokine Receptors Expressed in Primitive Blood Cells During Human Hematopoietic Ontogeny. *Stem Cells* **18**, 374–381 (2000).
237. Majka, M. *et al.* The limited infectability by R5 HIV of CD34⁺ cells from thymus, cord, and peripheral blood and bone marrow is explained by their ability to produce β -chemokines. *Exp. Hematol.* **28**, 1334–1342 (2000).
238. CLEMENTS, J. Biological and structural properties of MIP-1 α ; expressed in yeast. *Cytokine* **4**, 76–82 (1992).
239. Capmany, G., Querol, S., Cancelas, J. A. & García, J. Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34⁺ cells: Effects of FLT3-L and MIP-1 α on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* **84**, 675–82 (1999).
240. Mayani, H., Little, M. T., Dragowska, W., Thornbury, G. & Lansdorp, P. M. Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 α , TGF- β , and TNF- α on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34⁺ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp. Hematol.* **23**, 422–7 (1995).
241. Staversky, R. J. *et al.* The Chemokine CCL3 Regulates Myeloid Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Numbers. *Sci. Rep.* **8**, 14691 (2018).
242. Moreno, C. *et al.* CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* **42**, 854–862 (2005).
243. Turner, J.-E. *et al.* CCR5 Deficiency Aggravates Crescentic Glomerulonephritis in Mice. *J. Immunol.* **181**, 6546–6556 (2008).
244. Yanaba, K. *et al.* Role of C-C chemokine receptors¹ and⁵ and CCL3/macrophage inflammatory protein-1¹ in the cutaneous Arthus reaction: possible attenuation of their inhibitory effects by compensatory chemokine production. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3553–3561 (2004).
245. Wei, X. & Nielsen, R. CCR5- Δ 32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nat. Med.* **25**, 909–910 (2019).
246. Cahill, M. E., Conley, S., DeWan, A. T. & Montgomery, R. R. Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **18**, 282 (2018).
247. Lim, J. K. & Murphy, P. M. Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp. Cell Res.* **317**, 569–574 (2011).

248. Pozo, F. *et al.* CCR5 deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* **96**, 2074–2078 (2015).
249. Joy, M. T. *et al.* CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury. *Cell* **176**, 1143–1157.e13 (2019).
250. Słomiński, B. *et al.* CCR5 -Δ32 gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in patients with type 1 diabetes. *J. Diabetes Complications* **31**, 615–618 (2017).
251. Song, G. G., Kim, J.-H. & Lee, Y. H. The Chemokine Receptor 5 Delta32 Polymorphism and Type 1 Diabetes, Behcet's Disease, and Asthma: A Meta-analysis. *Immunol. Invest.* **43**, 123–136 (2014).
252. Elsner, H.-A. & Blasczyk, R. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue Antigens* **64**, 687–695 (2004).
253. González-Galarza, F. F. *et al.* Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D784–D788 (2015).
254. REDMO. Fundació Josep Carreras. *Memoria anual REDMO 2018* (2018).
255. Sainz, J., Veys, P. & Rocha, V. Umbilical cord blood transplantation in children and adults. in *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (eds. Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M. & Kröger, N.) 473–478 (Springer, 2019).