



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in
Fisiopatologia dell'insufficienza renale.
Ciclo XXI

**LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI
INDUCONO TOLLERANZA IN UN MODELLO
SPERIMENTALE DI TRAPIANTO DI RENE DI
RATTO**

**PROTECTIVE EFFECT OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN
RENAL TRANSPLANTATION**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Buzio.

Tutor:
Chiar.mo Prof. Salvatore David.

Dottorando: Dr. Pasquale Esposito

INDICE

Abstract (inglese)	pag. 3
Abstract (italiano)	pag. 4
Introduzione	pag. 5
Materiali e metodi	
Animali	pag. 9
Isolamento e coltura delle MSC	pag. 9
Immunocitochimica, caratterizzazione e differenziazione osteogenica ed adipogenica delle MSC	pag. 10
Reazione mista linfocitaria	pag. 10
Esperimenti in vivo	pag. 11
Procedura del donatore	pag. 12
Procedura del trapianto	pag. 12
Localizzazione delle cellule EGFP positive	pag. 13
Funzione renale	pag. 14
Istologia renale	pag. 14
Proliferazione delle cellule tubulari ed infiltrazione cellulare	pag. 15
Livelli di citochine nel tessuto renale	pag. 16
Livelli sierici di citochine	pag. 16
Analisi statistica	pag. 16
Risultati	
Caratterizzazione delle MSC di ratto	pag. 17
Soppressione della risposta da parte delle MSC	Pag. 17
Esperimenti in vivo	pag. 17
Funzione renale	pag. 17
Istologia renale	pag. 18
Localizzazione delle cellule EGFP-positive	pag. 19
Livelli di citochine sieriche e tissutali	pag. 20
Discussione	pag. 21
Figure e tabelle	pag. 25
Bibliografia	pag. 32

ABSTRACT

Introduction and aim

Mesenchymal Stromal Cells (MSC), are multipotent cells which can differentiate into various mature cell type. Because of the ability of MSC for multilineage adult cell differentiation, therapy with MSC has been tried in different types of experimental and human disease with the intent of replacing injured cells in damaged tissues. We investigated the effects of MSC on the function and histopathology of kidney allograft in the early post-transplant period. In addition, we have studied the effects of MSC on the systemic and renal expression of inflammatory cytokines.

Methods

We studied 4 groups of rats: A: non treated allogeneic transplantation, B: allogeneic transplantation treated with MSC, C: non treated syngeneic transplantation and D syngeneic transplantation treated with MSC. Serum and urine creatinine were measured before transplantation, 3 and 7 days after transplantation. Renal morphology was evaluated 7 days after transplantation. In addition, we measured both serum levels and tissue content of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Results

MSC significantly attenuated the fall in GFR caused by acute rejection at day 3, and provided a full recovery of GFR at day 7. Furthermore, MSC had a striking effect on rejection-related tissue injury, e.g. immune cell infiltration, tubulitis, vasculitis and glomerulitis. Infusion of MSC attenuated significantly the rise in IFN γ both in syngrafted and in allografted kidneys and caused a further rise in IL-10 in allografted kidneys. Treatment with MSC reduced serum IFN γ and IL-6 and increased IL-10 in

allografted rats.

Conclusions

Our study demonstrates *in vivo* that MSC infusion significantly attenuates acute renal allograft damage and improves renal recovery in experimental renal transplantation.

ABSTRACT

Introduzione e scopo

Le cellule mesenchimali staminali o stromali (MSC) sono cellule pluripotenti che sono in grado di differenziarsi in una grande varietà di linee cellulari. Le MSC sono in grado di migrare nei tessuti danneggiati e svolgere effetti antinfiammatori e immunomodulanti. Queste peculiari proprietà hanno spinto molti ricercatori ad ipotizzare un loro impiego nel trapianto d'organo. In questo studio abbiamo valutato se l'infusione di MSC modificasse gli indici di funzione renale ed il quadro istologico nel danno da rigetto acuto in un modello sperimentale di trapianto di rene di ratto.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 4 gruppi di ratti: Gruppo A: 10 ratti con allotrapianto non trattati, Gruppo B: 10 ratti con allotrapianto trattati con MSC, Gruppo C: 5 ratti con trapianto singenico non trattati e Gruppo D: 5 ratti con trapianto singenico trattati con MSC. Di questi ratti è stato studiato l'andamento della funzione renale (in basale, ai giorni 3 e 7) e il quadro istologico al 7° giorno dal trapianto. Inoltre, sono stati valutati i livelli tissutali e sierici di citochine con effetto pro e anti-infiammatorio.

Risultati

I ratti trattati con MSC hanno mostrato una miglior funzione renale ed un grado di tubulite, vasculite, glomerulite ed infiammazione (valutata come infiltrato di monociti-macrofagi e linfociti CD4 e CD8) significativamente meno severi rispetto ai ratti non trattati. L'analisi su tessuto e del siero ha mostrato nei ratti trattati un significativo aumento dei livelli di IL-10 (citochina anti-infiammatoria) ed una significativa riduzione dei livelli di IFN γ e citochine pro-infiammatorie (IL-6 e IL-1), rispetto ai

ratti non trattati.

Conclusione

Il nostro studio dimostra, in un modello sperimentale di trapianto di rene, che l'infusione di MSC attenua il danno renale indotto da rigetto acuto e modula la risposta immune, probabilmente attraverso un effetto sistemico sul pattern citochinico. Questi risultati potrebbero rappresentare un punto di partenza per l'impiego delle MSC nel trapianto renale nell'uomo.

INTRODUZIONE

Le cellule mesenchimali staminali (MSC) sono cellule pluripotenti che possono essere isolate dal midollo osseo dell'adulto, dal sangue periferico, dal tessuto adiposo e dai tessuti fetali. In particolari condizioni di coltura sono in grado di differenziarsi in una grande varietà di linee cellulari quali osteociti, adipociti, condrociti, miociti, cellule epiteliali, cellule del tessuto nervoso (1-2). Grazie alla loro capacità di aderire ad un substrato di materia plastica, possono essere facilmente espanse *in vitro* in quantità potenzialmente utili per le applicazioni terapeutiche (3-4).

Recentemente la Società Internazionale della Terapia Cellulare ha rinominato le Mesenchymal Stem Cells in Mesenchymal Stromal Cells definendo come criteri di identificazione la capacità di aderire alla plastica, la capacità di differenziarsi in osteociti, condrociti e adipociti, l'espressione sulla superficie dei markers quali CD105, CD73, CD90, l'assenza sulla superficie dei markers CD45, CD34, CD14, CD79 e di HLA-DR (5). E' noto che l'infusione di MSC in seguito ad un danno d'organo contribuisce alla rigenerazione di numerosi tessuti (rene, muscolo, cuore, osso, fegato). (6-8) Inizialmente tale effetto è stato attribuito alla capacità di MSC di migrare nei tessuti sede di danno e di differenziarsi in cellule mature, successivamente numerosi studi hanno dimostrato un meccanismo di tipo paracrino e/o endocrino (9-12). Le MSC sono caratterizzate, inoltre, dall'assenza sulla loro superficie degli antigeni MHC classe I e delle molecole co-stimolatorie CD40, CD80, CD86 e dalla moderata espressione degli antigeni MHC della classe II. Per tale motivo esse riescono a sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti T alloreattivi e delle cellule natural

killer (13). Oltre ad essere non immunogene, le MSC hanno attività immunoregolatoria. Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato infatti che le MSC inibiscono l'immunità cellulo-mediata secondo diverse vie (14): prevengono la risposta T-cellulare nella reazione mista linfocitaria allogenica (15); bloccano la differenziazione e maturazione delle cellule dendritiche indotta da alloantigeni (16); inibiscono la proliferazione di linfociti e cellule NK (17-18); inducono la differenziazione in cellule T reg e favoriscono la risposta mediata dai linfociti T Helper 2 rispetto a quella mediata dai T Helper 1 (14, 17). Questa modulazione della risposta cellulo-mediata porta a modificazioni del pattern di citochine circolanti: la produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL 2, TNF α , IFN γ e IL12 risulta inibita, mentre è aumentata la produzione di citochine anti-infiammatorie quali IL 4 e IL10, che inducono uno stato di tolleranza (14). Infine le MSC deprimono anche l'immunità umorale sopprimendo la proliferazione, la chemiotassi e la produzione di anticorpi da parte delle cellule B (19).

L'effetto immunosoppressivo di MSC è stato dimostrato anche *in vivo* in alcuni modelli animali sperimentali di trapianto solido (20), come trapianti di cute (21), cuore (22-23), fegato (24) e rene (25) e nell'uomo in pazienti affetti da Graft Versus Host Disease (GVHD) acuta e cronica (26,27).

Lo scopo del nostro studio è stato valutare in un modello sperimentale di trapianto di rene di ratto l'effetto dell'infusione di MSC e comprendere i meccanismi alla base della loro azione.

MATERIALI E METODI

ANIMALI

Gli esperimenti sono stati condotti secondo le linee guida del nostro comitato etico per gli studi su animali. Ratti Fisher F344, di undici settimane (Charles River, Calco, Italia), sono stati usati come donatori. Ratti Lewis RT1, di sette settimane (Charles River), sono stati usati come riceventi. Tutti i ratti erano maschi, di peso compreso tra 200 e 500 g.

Ratti Sprague-Dawley transgenici (SD), che esprimono enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Japan Slc, Inc, Hamamatsu, Japan) (28), sono stati usati come donatori di MSC.

ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC

Il sacrificio dei ratti Sprague Dawley transgenici per EGFP è stato eseguito mediante inalazione di CO₂. Il midollo osseo dei femori e delle tibie è stato prelevato dalle ossa usando una siringa con ago 26-gauge. Le cellule midollari EGFP positive sono state contate, piastrate ad una concentrazione di 10⁶ cellule/ml con mezzo di coltura Murine MesenCult (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con CO₂ al 5%. Dopo 48 ore di coltura, le cellule non aderenti sono state eliminate, è stato aggiunto nuovo mezzo di coltura, che poi è stato sostituito due volte a settimana. Raggiunta la subconfluenza, le cellule aderenti sono state lisate con tripsina 0,05% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Le cellule così ottenute sono state nuovamente piastrate ad una concentrazione compresa tra 0,05x10⁵/ml e 0,15x10⁵/ml in mezzo MesenCult per diversi passaggi.

*IMMUNOISTOCHEMICA, CARATTERIZZAZIONE E DIFFERENZIAZIONE
OSTEOGENICA E ADIPOGENICA DI MSC*

Le MSC EGFP positive coltivate a partire dal terzo passaggio sono state valutate mediante citometria a flusso per CD90, CD73 e CD45 (Becton Dickinson, San Josè, CA) usando il citometro a flusso FacsCalibur (BD Biosciences, San Josè, CA).

Al fine di indurre osteogenesi 3×10^6 di MSC/cm² sono state seminate in mezzo standard e coltivate con mezzo osteogenico per MSC (Cambrex, Walkersville, MD) cambiando lo stesso ogni 3 giorni per un periodo di 14 giorni. L'analisi istochimica delle cellule è stata effettuata valutando i depositi di calcio (colorazione Alizarin rosso). Per l'induzione della differenziazione in senso adipogenico, 2×10^4 di MSC/cm² sono state seminate in mezzo MesenCult. Raggiunta la confluenza le cellule sono state stimolate per 3 settimane con mezzo adipogenico, sostituendolo ogni 3 giorni. Le cellule sono state colorate con colorazione Oil-red O.

REAZIONE MISTA LINFOCITARIA

In esperimenti preliminari abbiamo valutato l'effetto tollerogenico delle MSC verificando la loro capacità a sopprimere la proliferazione delle cellule T in una reazione mista linfocitaria (MLR).

Le cellule mononucleate periferiche (PBMC) sono state isolate da ratti Fisher e Lewis con gradiente di centrifugazione Histopaque-1077 (Sigma Aldrich) e poi coltivate a 37° C per 1 ora. Le cellule sono state contate e la loro vitalità testata con trypan blue. Le PBMC di ratti Lewis (il ceppo ricevente il trapianto nel nostro modello di trapianto) e un numero uguale di PBMC di ratti Fisher (il ceppo donatore) irradiate (3Gy) sono state co-coltivate in triplicato in 200 µl di mezzo di coltura in presenza ed

in assenza di MSC (1×10^4). Al sesto giorno di coltura alle cellule sono stati aggiunti $0.5 \mu\text{Ci}$ di [^3H]-thymidine (Amersham Bioscience, Milano, Italy) per 21 ore. L'incorporazione della [^3H]-thymidine è stata misurata con oscillatore Beta (Top Count NXTTM PerkinElmer, MA, USA). I risultati sono stati espressi come media di oscillazione al minuto (CPM).

ESPERIMENTI IN VIVO

I reni dei ratti Lewis RT1 sono stati trapiantati in ratti Lewis RT1 per il modello di trapianto singenico. I reni dei ratti Fisher F344 sono stati trapiantati in ratti Lewis RT1 per il modello di trapianto allogenico. Tutti i riceventi hanno subito una nefrectomia bilaterale immediatamente prima del trapianto. Sono stati studiati 4 gruppi di ratti:

Gruppo A: 10 ratti con allotrapianto (da Fisher F344 a Lewis RT1) hanno ricevuto in arteria renale subito dopo la riperfusione 1 ml di PBS

Gruppo B: 10 ratti con allotrapianto (da Fisher F344 a Lewis RT1) hanno ricevuto in arteria renale subito dopo la riperfusione 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC.

Gruppo C: 5 ratti con trapianto singenico (da Lewis RT1 a Lewis RT1) hanno ricevuto in arteria renale subito dopo la riperfusione 1 ml di PBS.

Gruppo D: 5 ratti con trapianto singenico (da Lewis RT1 a Lewis RT1) hanno ricevuto in arteria renale subito dopo la riperfusione 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC

Nessuna terapia immunosoppressiva è stata somministrata.

Tutti i ratti sono stati tenuti in gabbie metaboliche in una stanza a temperatura (20°C) ed umidità (75%) costanti, sotto cicli luce-buio costanti, con libero accesso ad acqua e mangime standard. I ratti sono stati pesati quotidianamente con una bilancia Mettler PE-2000. L'urina delle 24 ore è stata raccolta e quantificata nei giorni 0, 3 e 7 ed i

campioni sono stati conservati a -20°C. Il sangue è stato prelevato ai giorni 0, 3, 7 dalla vena della coda e dopo averlo centrifugato il siero è stato conservato a -20°C. I ratti di ciascun gruppo sono stati sacrificati al giorno 7 e subito dopo il sacrificio i reni sono stati prelevati. I reni per metà sono stati fissati in una soluzione neutra di formalina al 10%, l'altra metà congelata in azoto liquido.

PROCEDURA NEL DONATORE

L'anestesia è stata indotta e mantenuta con iniezione intramuscolo di droperidolo (neurolettico-analgescico, 0.5 mg/100 g PC) e fentanyl (analgescico, 0.01 mg/100g PC). Dopo un'incisione mediana, il rene sinistro è stato delicatamente esposto; l'uretere è stato isolato ed è stato posizionato uno stent in polietilene (PE 10, *inner* Ø 0,28 mm interno- Becton Dickinson – USA). Una cannula è stata introdotta all'interno dell'aorta sottorenale fino all'ostio dell'arteria renale. E' stata somministrata una singola dose di eparina sodica (1000 UI) e poi il rene è stato immediatamente lavato con soluzione University of Winsconsin (UW; 4 ml, 4°C, alla velocità di 20 ml/ora). L'arteria renale è stata asportata assieme ad una porzione di aorta, la vena renale è stata sezionata prossimalmente alla sua giunzione con la vena cava e l'uretere in prossimità dello stent. Il rene è stato trapiantato immediatamente.

PROCEDURA DEL TRAPIANTO

Il rene sinistro del ricevente è stato delicatamente esposto, l'uretere è stato tagliato in prossimità della pelvi renale. L'arteria renale del ricevente è stata isolata e al suo interno è stato introdotto un micro-catetere in perfluorocarbon (inner Ø 200 µm). Sono poi state effettuate consecutivamente la nefrectomia sinistra e destra. L'aorta e la

vena cava del ricevente sono state occluse con clamps vascolari; tra l'arteria renale del donatore e l'aorta del ricevente è stata effettuata un'anastomosi termino-laterale con un filo 9/0 monofilamento; la stessa procedura è stata effettuata tra la vena renale del donatore e la vena cava del ricevente. Per consentire la ri-perfusione dell'organo trapiantato sono state rimosse le clamps vascolari; poi, con la stessa tecnica di sutura usata per i vasi, è stata eseguita un'anastomosi termino-terminale tra i due ureteri introducendo lo stent endoureterale del donatore nel lume ureterale del ricevente. Dopo 5 minuti dalla ri-perfusione è stata effettuata l'infusione endo-arteriosa di MSC utilizzando il micro-catetere posizionato all'interno dell'arteria renale sinistra del ricevente. Per fare in modo che il rene trapiantato fosse il primo organo attraversato dalla soluzione contenente MSC, è stata temporaneamente occlusa l'aorta posizionando una clamp vascolare distalmente all'anastomosi arteriosa. Al termine la laparotomia è stata chiusa con un filo da sutura di seta 3/0 ed è stata somministrata una singola dose intramuscolo di ciprofloxacina (5mg). L'esecuzione delle anastomosi vascolari non ha richiesto più di 45 minuti e la durata totale dell'intervento non ha superato i 90 minuti. Gli animali sono stati posti in una camera con ciclo luce/buio con libero accesso ad acqua di rubinetto e mangime per ratti.

LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE EGFP-POSITIVE

Sezioni sagittali di reni fissati in formalina e poi inclusi in paraffina sono state tagliate al microtomo ad uno spessore di 3 μ m e poi raccolte su vetrini coattati con collante in poli-lisina (DAKO). Le sezioni sono state poi reidratate mediante passaggio di 5 min nella scala discendente degli alcoli (100, 95, 90, 80%), passate rapidamente in acqua distillata per verificarne la corretta sparaffinatura e successivamente incubate in H₂O₂

3,7% in acqua distillata (vol/vol) per 15 min per inibire la perossidasi endogena. Dopo breve lavaggio in PBS, le sezioni sono state processate al microonde (2-4 cicli di 5 min in tampone citrato 0.01 mol/L, pH 6.0, 480 watts) per lo smascheramento dell'antigene. Dopo lavaggio in PBS le sezioni sono state incubate overnight a 4°C con anticorpo monoclonale anti-GFP (ICN) diluito 1:1000 in PBS/BSA 1%. Le cellule EGFP-positive sono state visualizzate con il complesso biotina-streptavidina-perossidasi e colorate con 3,3 diaminobenzidina (DAKO). Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Harris. Il controllo negativo consisteva nella omissione dell'anticorpo primario nella reazione antigene-anticorpo; i controlli positivi erano sezioni di rene di ratto transgenico per EGFP. Le cellule positive per EGFP sono state contate ad alto ingrandimento (X400) utilizzando un microscopio Nikon E400 collegato con camera digitale (DN Digital Net Nikon).

FUNZIONE RENALE

La creatininemia e la clearance della creatinina sono state misurate al giorno 0, 3 e 7 con metodica automatizzata (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

ISTOLOGIA RENALE

Sezioni fini di 3 μ m fissate in formalina sono state colorate con ematossilina-eosina, periodic acid-Schiff (PAS) e classificate secondo lo score di Banff (29) da due investigatori in doppio cieco, usando un microscopio Olympus IX8.

Sono state valutate:

a) *Tubulite*:

per ogni animale studiato sono stati esaminati 250 sezioni tubulari da 5 sezioni

istologiche non consecutive. Ogni campo è stato valutato come segue: t0: no tubulite ; t1: da 1 a 4 cellule infiltranti/ sezione tubulare, t2: da 5 a 10 cellule infiltranti/ sezione tubulare; t3: > 10 cellule infiltranti/ sezione tubulare, o presenza di almeno 2 aree di distruzione di membrana basale tubulare.

b) *Arterite:*

per ogni animale studiato sono stati esaminati 10 arterie da 10 sezioni istologiche non consecutive. L'arterite è stata valutata come segue: v0: no arterite; v1: lieve-moderata in almeno 2 arterie; v2 : arterite intimale severa con riduzione del lume di almeno il 25% in un'arteria; v3: arterite trasmurale o necrosi fibrinoide con infiltrazione di linfociti nella parete vasale.

c) *Glomerulite:*

per ogni animale studiato sono stati esaminati da 10 sezioni istologiche non consecutive. Ogni sezione è stata valutata come segue: g0: no glomerulite; g1: glomerulite in meno del 25% dei glomeruli; g2: glomerulite segmentale o globale nel 25- 75% dei glomeruli; g3: glomerulite > 75% dei glomeruli.

PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE TUBULARI ED INFILTRAZIONE CELLULARE

La proliferazione delle cellule tubulari è stata valutata come numero di cellule esprimenti il Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, rivelato con anti -PCNA mAb, 1:1000, Dako) in 5 sezioni istologiche non sequenziali.

In aggiunta sono state studiate con immunistochemica (×400) le cellule infiltranti; in particolare sono stati valutati i macrofagi (ED-1 Ag) e i linfociti CD8 in tessuti fissati con formalina e CD4 in sezioni congelate. In breve, sezioni fini di 3 µm sono state

trattate al micro-onde per svelare gli antigeni, che poi sono stati bloccati con PBS/BSA 1 % v/v e marcato con i seguenti anticorpi: 1) anti-ED-1, 1:200 (Serotec Ltd); 2) anti CD8, 1:1500 (Serotec Ltd) 3) anti CD4, 1:100 (Serotec Ltd). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati con biotina-streptavidina-perossidasi e 3,3-diaminobenzidine (DakoCytomation). I controlli negativi erano rappresentati dall'omissione dell'anticorpo primario e dalla sostituzione con il controllo isotipico dell'anticorpo primario.

LIVELLI DI CITOCHINE NEL TESSUTO RENALE

I livelli delle citochine IL1, IL2, IL 4, IL6, IL10 e IFN γ sono stati quantificati su sezioni di tessuto renale omogenato secondo la metodica del protein array (SearchLight Rat Cytokine Array , Pierce, Rockford, USA).

LIVELLI SIERICI DI CITOCHINE

I livelli di IL1, IL2, IL4, IL-6, IL 10 e IFN γ sono stati misurati al giorno 7 sul siero dei ratti con metodo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA).

ANALISI STATISICA

Il test ANOVA seguito dal test Newman-Keuls o dal t test di Student sono stati usati per paragonare le medie. Le differenze tra gli score di danno renale sono state valutate con i tests Mann-Withney e Kruskal-Wallis.

RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DI RATTO

MSC isolate dal midollo osseo di ratti Sprague-Dawley EGFP sono state caratterizzate con metodiche di immunistochemica per la loro capacità di differenziare in cellule osteogeniche ed adipogeniche quando coltivate in condizioni appropriate (figura 1). L'analisi citofluorometrica ha mostrato che le MSC erano positive per CD90 ($\geq 95\%$), CD73 ($\geq 95\%$) ed erano negative per CD45 ($< 5\%$).

SOPPRESSIONE DELLA RISPOSTA T DA PARTE DELLE MSC

Le PBMC dei ratti riceventi il trapianto, ceppo Lewis, stimulate dalla co-coltura con le PBMC Fisher irradiate hanno mostrato una importante capacità proliferativa. L'aggiunta delle MSC dei ratti SD transgenici EGFP è stata capace di inibire tale proliferazione (figura 2).

ESPERIMENTI IN VIVO

Durante lo studio non è stata osservata alcuna differenza significativa nel peso corporeo ed assunzione di acqua e cibo tra i gruppi di ratti. L'iniezione di MSC non si è associata a nessuna apparente compromissione delle funzioni vitali, dispnea o morte.

FUNZIONE RENALE

La creatinina e la clearance della creatinina erano normali per tutti i gruppi prima del trapianto (giorno -1). Il GFR era simile nei trapianti singenici senza o con MSC (gruppi C e D). Nei ratti con trapianto allogenico non trattati con MSC (gruppo A) il

GFR era ridotto sia al 3 che al 7 giorno, quando comparato con gli altri gruppi, in particolare il gruppo B, ovvero i ratti con trapianto allogenico trattati con MSC. Inoltre, nei ratti del gruppo B il GFR appariva non significativamente diverso rispetto ai ratti con trapianto singenico. (Figura 3)

ISTOLOGIA RENALE

Tubulite.

Non è stata trovata evidenza di tubulite nei ratti con trapianto singenico. La tubulite era presente nei ratti con allotrapianto (figure 4 e 5) ma era meno severa nei ratti trattati con MSC. Infatti in questi ratti il 64% delle sezioni non presentavano tubulite a confronto del 36% nei ratti non trattati. Inoltre, il 21% delle sezioni tubulari dei ratti non trattati presentava uno score t2/t3 a fronte del solo 5% nei ratti trattati con MSC.

Proliferazione tubulare

Le cellule esprimenti PCNA erano aumentate nei reni dei ratti trattati con MSC e risultavano significativamente maggiori nei ratti con allotrapianto rispetto ai ratti con trapianto singenico. (figura 6)

Vasculite.

La vasculite era assente nei trapianti singenici. Nei trapianti allogenici non trattati con MSC la vasculite appariva severa con il 70 % delle arterie in score v3, mentre nei trapianti trattati con MSC solo il 33% delle arterie presentava score v3. Di converso, nei ratti non trattati il 17% delle arterie era normale, mentre questa percentuale saliva al 50% nei ratti trattati. (figura 7).

Glomerulite

La glomerulite era assente nei trapianti singenici. Essa era significativamente più severa nei ratti con trapianto allogenico non trattati. Lo score g3 era presente nel 14% dei ratti non trattati contro il 2% dei ratti trattati con MSC. Di converso, nei ratti non trattati il 2% dei glomeruli era normale, mentre questa percentuale saliva al 38% nei ratti trattati. (figura 8).

Infiltrato monocitario.

Abbiamo valutato il numero di monociti infiltranti come numero di cellule ED-1 positive. Nei ratti con trapianto singenico vi erano pochi monociti sia in quelli trattati che in quelli non trattati. Al contrario, negli allotrapianti vi era un maggiore infiltrato monocitario che risultava, comunque, significativamente ridotto nei ratti trattati con MSC. (figura 9)

Infiltrato CD4+ e CD8+

Così come per i monociti, anche i linfociti CD4 e CD8 infiltranti erano pochi nei ratti con trapianto singenico, mentre nei ratti con allotrapianto risultavano significativamente meno presenti nei ratti trattati con MSC. (figura 10)

LOCALIZZAZIONE CELLULE EGFP-POSITIVE

Nel tessuto renale di ratti sacrificati, a cui sono state infuse MSC al momento del trapianto, è stata riscontrata la presenza di rarissime cellule EGFP-positive a 7 giorni dal trapianto. Le cellule erano localizzate nel glomerulo, nei tubuli e nell'interstizio. (figura 11)

LIVELLI DI CITOCHINE SIERICHE E TISSUTALI

I livelli tissutali post-trapianto di IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-10 erano significativamente maggiori in tutti i gruppi, quando comparati ai livelli pre-trapianto. I gruppi di ratti trattati con MSC, sia singenici che allogenici, presentavano un ridotto incremento di IFN γ , mentre i ratti con trapianto allogenico trattati con MSC mostravano i livelli più elevati di IL-10. (tab 1) Nei riceventi allogenici il trapianto determinava un incremento dei livelli sierici di citochine, eccetto che per IL-4, mentre IFN γ e IL-1 risultavano incrementate anche nei riceventi singenici. I gruppi di ratti allogenici trattati con MSC presentavano ridotti livelli di IFN γ e IL-1 e livelli maggiori di IL-10. Lo stesso andamento di IFN γ e IL-10 era evidenziabile nei ratti con trapianto singenico trattati con MSC. (tab 2)

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato in un modello sperimentale di trapianto di rene di ratto l'efficacia dell'infusione di MSC nell'attenuare il rigetto acuto sia in termini di funzione renale che di danno istologico. I nostri dati mettono in evidenza che i ratti trattati con MSC presentano una migliore funzione renale ed un grado di tubulite, vasculite, glomerulite ed infiammazione (valutata come infiltrato di monociti-macrofagi e linfociti CD4 e CD8) significativamente meno severi rispetto ai ratti non trattati.

La terapia immunosoppressiva attualmente utilizzata nei pazienti sottoposti a trapianto di rene è molto efficace nel prevenire il rigetto ma è gravata da numerosi effetti collaterali. Le MSC sono cellule in grado di migrare nei tessuti danneggiati o sede di infiammazione e svolgere effetti antinfiammatori e immunomodulanti. Queste peculiari proprietà hanno spinto molti ricercatori ad ipotizzare un loro ruolo nel trapianto d'organo (30,31) e pertanto a studiare i loro effetti in modelli sperimentali animali di trapianto d'organo solido. Nel trapianto di cute è stato dimostrato che la somministrazione di MSC prolungava la sopravvivenza della cute in un babuino.(21) In un più recente lavoro (23) veniva anche dimostrato che l'infusione nella vena porta di MSC nel topo prima di un trapianto di cuore prolungava significativamente la sopravvivenza dell'organo trapiantato ed induceva tolleranza attraverso un aumento della popolazione di linfociti T reg nell'organo trapiantato. Nell'uomo i risultati più significativi sull'utilizzo di MSC sono stati riportati da Le Blanc (26,27), che ha dimostrato un successo terapeutico nel trattamento di graft-versus-host disease severa

resistente alla terapia tradizionale. Per quanto riguarda il trapianto di rene è stato pubblicato un solo studio su di un modello di trapianto di rene di ratto, dove l'effetto di MSC era confrontato con quello della combinazione di MSC e ciclosporina (25), ma i risultati sono discutibili in quanto il numero di animali studiati era esiguo. Con lo studio qui presentato abbiamo, invece, valutato se l'infusione di MSC in monoterapia modificasse gli indici di funzione renale ed il quadro istologico nel danno da rigetto acuto. Per verificare la capacità tollerogena delle MSC impiegate nel nostro studio, abbiamo prima testato *in vitro* la loro capacità di inibire la proliferazione cellulare nell'ambito di una coltura mista linfocitaria tra cellule del ceppo di ratto ricevente (Lewis) e donatore (Fisher). Abbiamo così evidenziato una potente attività inibitoria delle MSC, confermando dati già riportati in letteratura (15). Queste stesse cellule infuse al momento del trapianto hanno permesso di ottenere, nei ratti trattati, una miglior funzione renale dopo 3 e 7 giorni dal trapianto, rispetto ai ratti non trattati. Sia la creatininemia che la clearance della creatinina al 7° giorno nei ratti con trapianto allogenico e MSC raggiungevano livelli non significativamente differenti da quelli dei ratti che erano stati sottoposti ad un trapianto singenico. Dal punto di vista istologico, l'infusione delle MSC ha determinato una drastica riduzione della tubulite, dimezzando il numero dei tubuli danneggiati, della glomerulite e la quasi totale assenza di arterite severa, importante alterazione istologica tipica del rigetto acuto. La terapia con MSC è stata anche capace di limitare l'infiammazione tissutale, con una sostanziale e significativa riduzione dei monociti e dei linfociti infiltranti. Inoltre, come evidenziato dalla maggior presenza di cellule tubulari proliferanti (PCNA-positive) nei ratti trattati, le MSC hanno stimolato un più rapido recupero del danno tubulare conseguente al trapianto.

Un secondo obiettivo del nostro lavoro è stato quello di tentare di fare chiarezza sui meccanismi alla base dell'effetto delle MSC nel trapianto di rene. Abbiamo, pertanto, in prima battuta ricercato le MSC (EGFP positive) nel tessuto renale. Nel nostro modello le MSC sono state somministrate nell'arteria renale subito dopo la riperfusione affinché tutte le cellule infuse avessero contatto con il tessuto renale prima di essere intrappolate dal circolo polmonare o fermarsi nella milza. Il numero di MSC infuse è stato deciso in base alla esperienza che il nostro gruppo di ricerca aveva maturato in un lavoro precedente, dove l'infusione di MSC in un modello sperimentale di glomerulonefrite mesangioproliferativa nel ratto riduceva il danno renale.⁽³²⁾ L'analisi istologica delle sezioni renali ha mostrato solo rarissime MSC EGFP positive nel rene, tanto rare da non poter giustificare che il loro effetto sia mediato dalla differenziazione in cellule renali. Per tale motivo, ipotizzando che il meccanismo d'azione delle MSC fosse paracrino e/o endocrino, abbiamo valutato i livelli di citochine nel tessuto renale e in circolo.

L'analisi su tessuto ha mostrato nei ratti trattati un significativo aumento dei livelli di IL-10 (citochina anti-infiammatoria) ed una significativa riduzione dei livelli di IFN γ rispetto ai ratti non trattati. Anche in circolo i ratti trattati con MSC hanno mostrato una significativa riduzione delle citochine proinfiammatorie, IFN γ , IL-6 e IL-1, rispetto ai ratti non trattati. Non si sono riscontrate significative differenze nei livelli di IL-2 e IL-4, mentre i livelli sierici di IL-10, così come il livelli tissutali, sono risultati significativamente aumentati nei ratti trattati con MSC. Questi dati suggeriscono che, perlomeno nel nostro modello sperimentale, gli effetti di MSC sulla funzione renale e sul danno istologico sono associati ad una modificazione del pattern citochinico che

modula la risposta immune a favore della tolleranza. I nostri risultati sono suffragati da numerosi studi *in vitro* che dimostrano che le MSC inducono un effetto immunosoppressivo interagendo con il sistema immune in numerosi modi (14). Come anche sopra riportato, le MSC infatti influenzano la proliferazione, la differenziazione e la funzione di linfociti T, cellule dendritiche, T reg, linfociti B e cellule NK. (15-18) Inoltre, alcuni autori hanno anche ipotizzato che *in vivo* le MSC guidano la risposta immune verso la tolleranza migrando direttamente verso i tessuti linfoidei, dove interagiscono con le cellule immuni. (23) Un'ulteriore altra ipotesi avanzata si basa sulla premessa che il triptofano è necessario per la proliferazione delle cellule T. Le MSC esprimono indoleamina 2,3-diosigenasi (IDO), un enzima citoplasmatico che catalizza la conversione del triptofano in kynurenina, privando le cellule T di triptofano e sopprimendo in questo modo la loro crescita. (33) I meccanismi di azione delle MSC sono, quindi, molteplici, complessi e probabilmente inter-correlati e pertanto, altri studi sono necessari per ottenere una migliore comprensione di questo composito pathway.

Il nostro studio, comunque, mette in evidenza un importante effetto sistemico delle MSC sulle citochine pro e anti-infiammatorie e dimostra per la prima volta, in un modello sperimentale di trapianto di rene, che l'infusione di MSC attenua il danno renale indotto da rigetto acuto e modula la risposta immune inducendo tolleranza. Riteniamo che questi risultati possano fornire un razionale e rappresentare un punto di partenza per il disegno di studi sperimentali che prevedano l'impiego delle MSC nel trapianto renale nell'uomo.

FIGURE E TABELLE

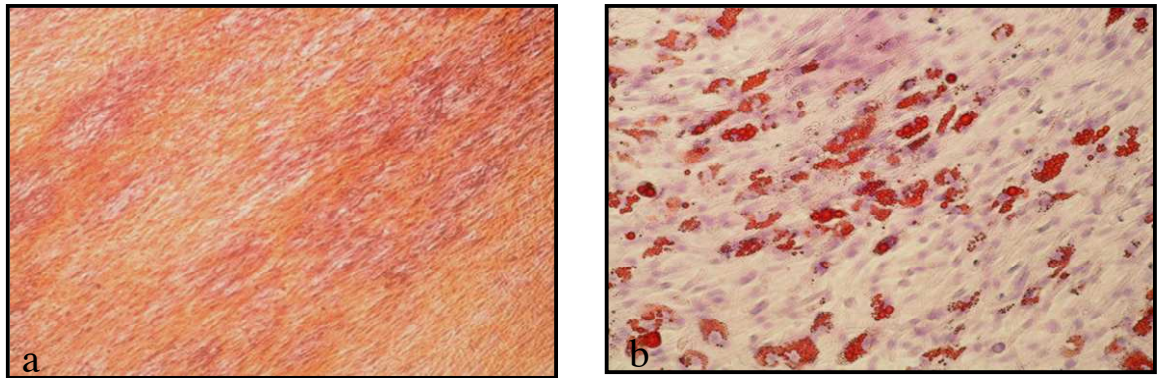


FIG.1

a) La differenziazione osteogenica di MSC è dimostrata dalla formazione di aree di calcio idrossiapatite colorate in rosso Alizarin (X100);

b) La differenziazione adipogenica di MSC è dimostrata dalla presenza di vacuoli di lipidi intracellulari colorati in rosso da Oil Red O (X100)

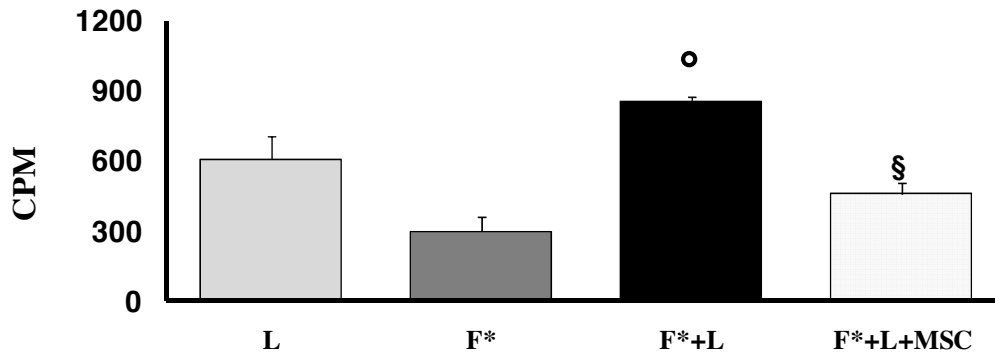


FIG. 2- Reazione mista linfocitaria

L: PBMC del ricevente, F*: PBMC irradiate del donatore , F*+L: co-cultura in assenza di MSC, F*+L+MSC co-cultura in presenza di MSC.

Le colonne rappresentano la media delle oscillazioni al minuto \pm SD.

°p< 0.01 vs L e F*, § p<0.05 vs F*+L

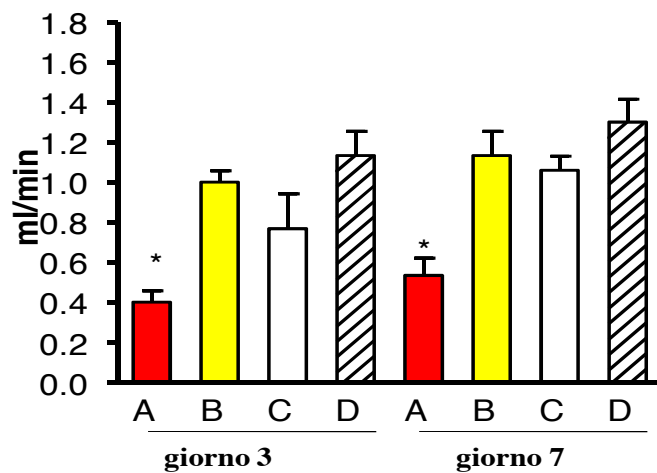


FIG. 3

Le colonne rappresentano la clearance della creatinina media (ml/min) \pm SD.

A: Ratti con allotrapianto non trattati con MSC; B: Ratti con allotrapianto trattati con MSC .

C: Ratti con trapianto singenico non trattati con MSC , D: Ratti con trapianto singenico trattati con MSC. * $p < 0.01$ vs B, C, D ;

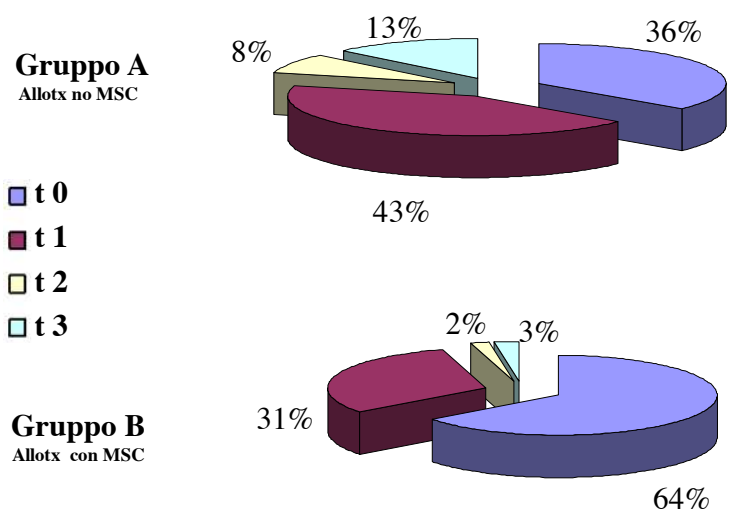


FIG. 4- Tubulite

I gruppi sono definiti in figura 3.

I numeri esprimono la percentuale di tubuli in score t0, t1, t2, t3 al giorno 7. $p < 0.001$ A vs B

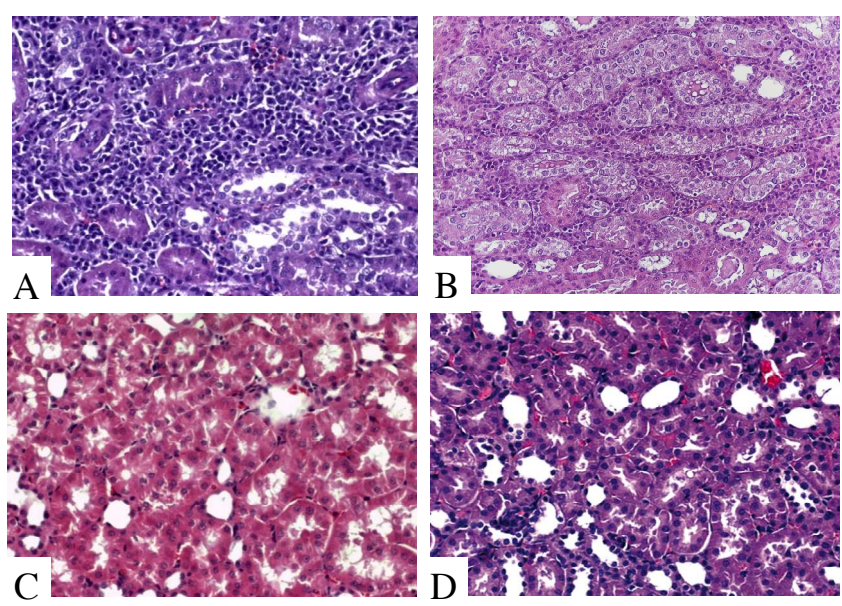


FIG. 5 – Tubulite

Ematossilina-eosina di sezioni istologiche al giorno 7 (X 200).

Pannello A : gruppo A ; pannello B : gruppo B; pannello C: gruppo C; pannello D: gruppo D.

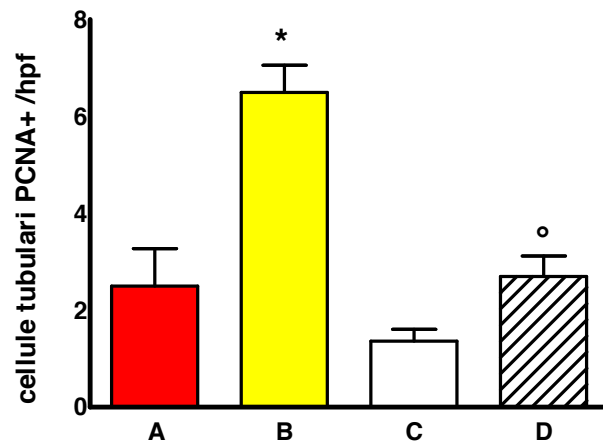


FIG.6- Proliferazione cellule tubulari

Le colonne rappresentano il numero di cellule tubularu PCNA+ per HPF (media± SD).
 * p<0.0001 vs A,C,D; ° p<0.01 vs C

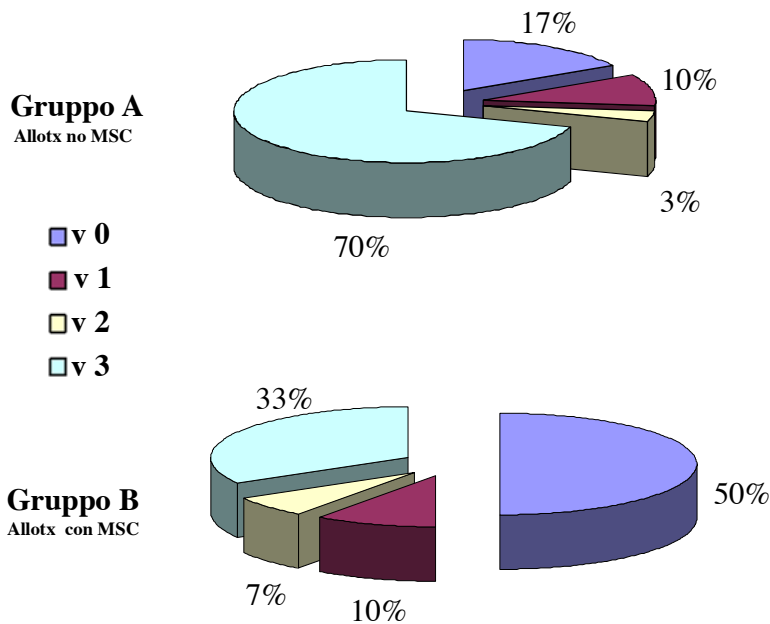


FIG. 7- Vasculite

I gruppi sono definiti in figura 3.

I numeri esprimono la percentuale di arterie in score v0, v1, v2, v3 al giorno 7. p<0.001 A vs B

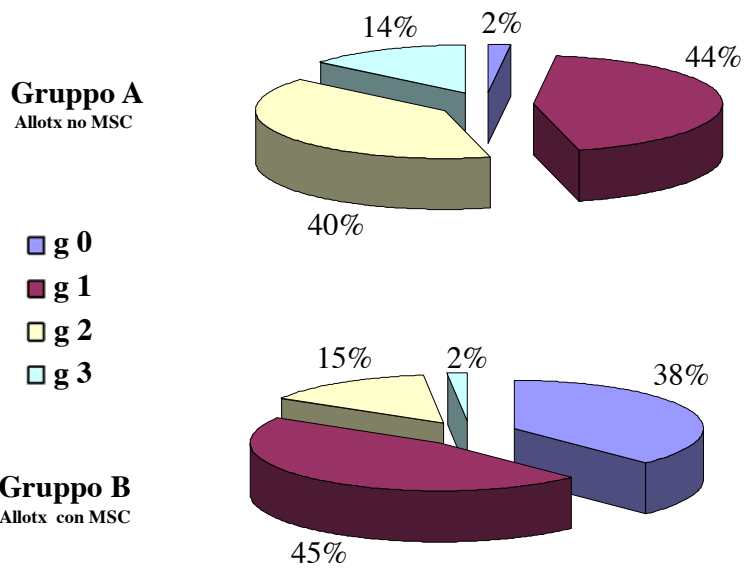


FIG. 8- Glomerulite

I gruppi sono definiti in figura 3.

I numeri esprimono la percentuale di glomeruli in score g0, g1, g2, g3 al giorno 7. $p < 0.001$ A vs B

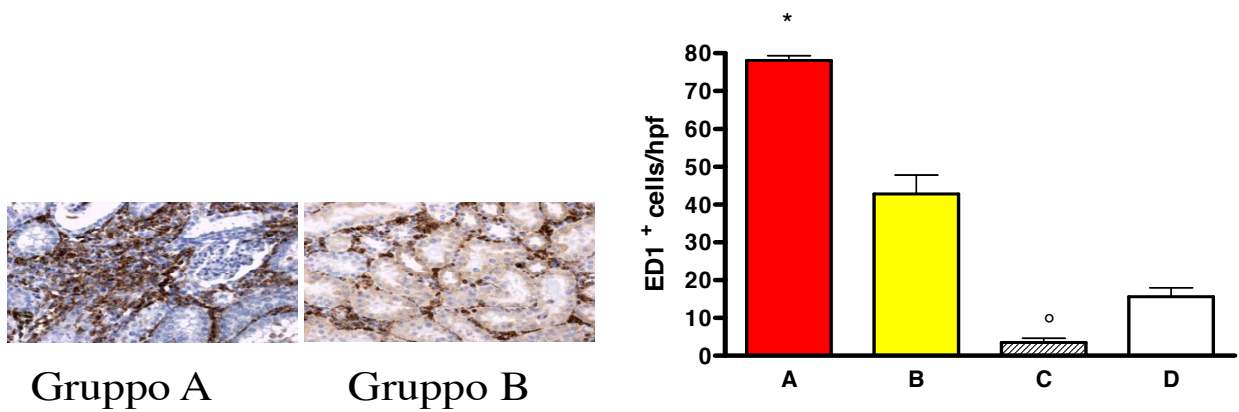


FIG. 9 – Infiltrato monocitario

I gruppi sono definiti in figura 3.

Pannello a: Espressione rappresentativa di ED1 in ratti dei gruppi A e B. (X 200).

Pannello b: Le colonne rappresentano le cellule ED1 positive (media \pm SD). * $p < 0.005$ vs B, C, D; $^{\circ}p < 0.001$ vs A, B.

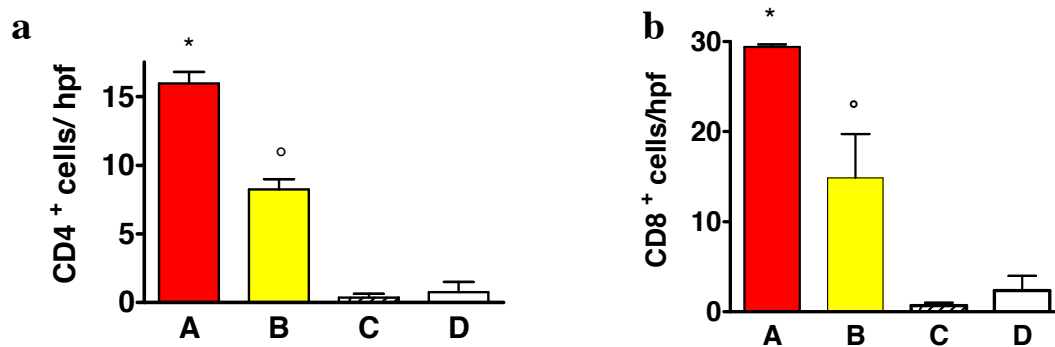


FIG. 10 – Infiltrato cellule CD4 e CD8

I gruppi sono definiti in figura 3.

Pannello a: Le colonne rappresentano le cellule CD4 positive (media \pm SD). * $p < 0.001$ vs B, C, D; $^{\circ}p < 0.001$ vs C, D

Pannello b: Le colonne rappresentano le cellule CD8 positive (media \pm SD). * $p < 0.01$ vs B, C, D; $^{\circ}p < 0.05$ vs C, D.

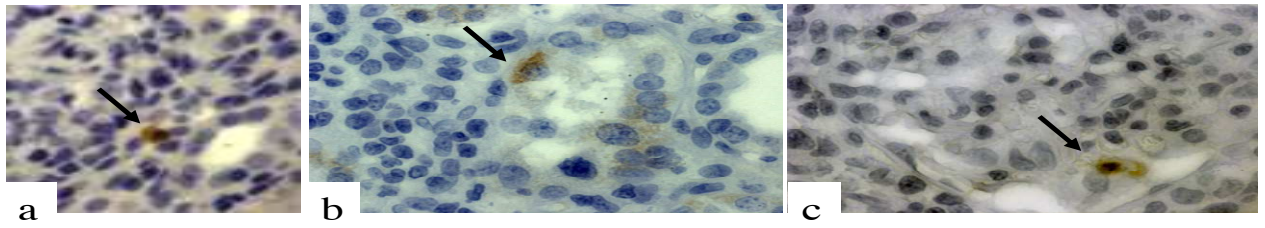


FIG. 11- Localizzazione MSC

MSC-EGFP riscontrate 7 giorni dopo il trapianto a livello interstiziale (a), tubulare (b) e glomerulare (c), (X 400).

pg/ml	Pre-Tx	A	B	C	D	p
IFN-γ	35.2 \pm 0.02§	206.3 \pm 64.4°	116.7 \pm 56.1	130.7 \pm 6.5*	87.3 \pm 25.5	§p<0.005vsA,B,C,D; °p<0.005vsB,C,D; *p<0.05vs D
IL-10	8.6 \pm 1.4 §	25.53 \pm 0.7	42.2 \pm 10.6 °	39.2 \pm 10.1	22.9 \pm 15.2	§p<0.005vsA, B,C,D °p<0.001vs A
IL-6	117.7 \pm 11.36°	245.5 \pm 28.8	283.0 \pm 32.7	231.7 \pm 14.1	312.1 \pm 53.6	°p<0.001vs A,B,C,D
IL-2	140.6 \pm 0.14°	227 \pm 93.1	262 \pm 103.4	236.9 \pm 65.8	320.2 \pm 70.3	°p<0.005vsA,B,C,D
IL-1	235.8 \pm 134.4°	505.4 \pm 219.7	493 \pm 142	500 \pm 0	517 \pm 0	°p<0.005vs A,B,C,D
IL-4	13.05 \pm 1.4	26.6 \pm 6	32.8 \pm 5.2	34.5 \pm 3.8	24.55 \pm 2.5	NS

TAB. 1 - Livelli tissutali di citochine pro- e anti-infiammatorie

I gruppi sono definiti in figura 3.

Pre-tx: livelli di citochine prima del trapianto

A,B,C,D: livelli di citochine nei rispettivi gruppi a 7 giorni dal trapianto. Media \pm SD.

pg/ml	Pre-Tx	A	B	C	D	p
IFN-γ	14 \pm 0.08°	151.2 \pm 78.6§	86.7 \pm 32.1	34.5 \pm 0.01#	7.2 \pm 0.2	°p<0.0001 vs A,B,C,D; #p<0.001 vs D; §p<0.05 vs B,C
IL-10	0°	83.9 \pm 9.7*	139.1 \pm 20.4	0	9.3 \pm 0.01#	°p<0.0001 vs A,B,D; #p<0.005 vs C; *p<0.05 vs B,D
IL-6	0°	183 \pm 61.01#	14.09 \pm 0.06	0	0	°p<0.0001 vs A,B; #p<0.05 vs B
IL-2	0°	61.0 \pm 24.7	94.6 \pm 61.0	0	0	°p<0.05 vs A,B
IL-1	0°	1515 \pm 613	1843 \pm 670	20.1 \pm 1.2	30 \pm 1.1#	°p<0.005 vs A,B,C,D; #p<0.005 vs A,B
IL4	0	0	0	0	0	

TAB. 2 - Livelli sierici di citochine pro- e anti-infiammatorie

I gruppi sono definiti in figura 3.

Pre-tx: livelli di citochine prima del trapianto

A,B,C,D: livelli di citochine nei rispettivi gruppi a 7 giorni dal trapianto. Media \pm SD.

BIBLIOGRAFIA

1. Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
2. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental and biological Medicine*, 226: 507-520, 2001.
3. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry and cell biology* 36: 568-584, 2006.
4. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115-202, 2008 .
5. Dominici M, Le Blanc K, Muller I, Slaper-Cortenbach I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, vol.8, n. 4: 315-317, 2006.
6. Nagaya N, Fujii T, Iwase T et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2670-H2676, 2004.
7. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *International Journal of Molecular Medicine*, 14: 1035-1041, 2004.
8. Morigi M, Inrona M, Imberti B et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*, 26(8): 2075-82, 2008.
9. Kunter U, Rong S, Djuric Z et al. Transplanted mesenchymal stem cells

accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2202-2212, 2006.

10. Tögel F, Hu Z, Weiss K et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F31-F42, 2005.

11. Bi B, Schmitt R, Israilova M et al. Stromal cells protect against acute tubular injury *via* an endocrine effect. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18:2486-2496, 2007.

12. Humphreys BD, and Bonventre, J.V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu. Rev. Med.* 59:311-325, 2008.

13. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31: 890-896, 2003.

14. Aggarwal S and Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood*, 19: 1815-1822, 2005

15. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 57: 11-20, 2003.

16. Jang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, vol.105, n. 10: 4120-4126, 2005.

17. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of Biomedical Science* 12:47-57, 2005.

18. Spaggiari MG, Capobianco A, Abdelrazik H et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of

- indoleamina 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111,(3): 1327-1333, 2008.
19. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, vol. 107, n. 1: 367-372, 2006.
 20. Zhang X, Jiao C and Zhao S. Role of Mesenchymal Stem Cells in Immunological Rejection of Organ Transplantation. *Stem Cell Rev and Rep*, 19 giugno 2009 (Epub)
 21. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30: 42-48, 2002.
 22. Zhou HP, Yi DH, Yu SQ et al. Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. *Transplant Proc*. 2006 ;38(9):3046-51
 23. Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J. Immunol*. 181:3933-3946, 2008.
 24. Chi-Dan Wan, Rui Cheng, Hong-Bo Wang et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7(1): 29-33, 2008
 25. Zhang W, Qin C, Zhou ZM. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):3404-8
 26. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of Severe Acute Graft Versus Host Disease With Third Party Haplo-identical Mesenchymal Stem Cells. *The Lancet*, 363: 1439-1441, 2004.
 27. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L et al. Mesenchymal stem cells for treatment

of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*, 371: 1579-1586, 2008.

28. Okabe M, Ikawa M, Kominami K et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319,1997

29. Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 8(4):753-60, 2008

30. Uccelli A, Pistoia V and Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology*, vol.28, n. 5:219-226, 2007.

31. Jones BJ and McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol*, 36 733-741, 2008.

32. Rampino T, Gregorini M, Bedino G et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate renal injury in anti-Thy 1 nephritis by modulating release of inflammatory cytokines and scatter factors. *Laboratory Invest* 2010 (lavoro accettato)

33. Jones BJ, Brooke G, Atkinson K et al. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta*, 28(11-12):1174-81, 2007