

L'INFUSIONE DI CELLULE MESENCHIMALI STROMALI RIDUCE IL DANNO DEL RIGETTO ACUTO IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI TRAPIANTO DI RENE NEL RATTO

Teresa Rampino¹, Marilena Gregorini¹, Francesca Bosio¹, Giulia Bedino¹, Valeria Corradetti¹, Chiara Rocca¹, Teresa Valsania¹, Eleonora Francesca Pattonieri¹, Giovanni Piotti¹, Grazia Soccio¹, Sandro Zonta², Michela De Martino², Paolo Dionigi², Francesco Frassoni³, Antonio Dal Canton¹

¹Dipartimento Area Medica, Struttura Complessa di Nefrologia, Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo, Pavia

²Dipartimento di Chirurgia Generale, Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo, Pavia

³Dipartimento di Ematologia, Ospedale San Martino, Genova

Le Cellule Mesenchimali Stromali (MSC) sono cellule pluripotenti, in grado di differenziarsi in una grande varietà di linee cellulari, quali osteociti, adipociti, condrociti, miociti e cellule epiteliali. Esse possono essere isolate dal midollo osseo dell'adulto e, grazie alla loro capacità di aderire a un substrato di materia plastica, possono essere facilmente espanse *in vitro* in quantità potenzialmente utili per le applicazioni terapeutiche. È noto da tempo che l'infusione di MSC in seguito a un danno d'organo contribuisce alla rigenerazione di numerosi tessuti (1). Peculiarità delle MSC sono l'assenza sulla loro superficie degli antigeni MHC di classe I e delle molecole costimolatorie CD40, CD80 e CD86 e la moderata espressione degli antigeni MHC della classe II. Per tali caratteristiche, le MSC riescono a sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti T alloreattivi e delle cellule *natural killer* (NK). Oltre a essere non immunogene, le MSC hanno un'attività immunoregolatoria. Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato, infatti, che le MSC inibiscono diverse vie dell'immunità cellulo-mediata: prevengono la risposta T-cellulare nella reazione mista linfocitaria allogenica, bloccano la differenziazione e la maturazione delle cellule dendritiche indotte da alloantigeni, inibiscono la proliferazione di linfociti e cellule NK, inducono la differenziazione in cellule T regolatorie (T reg) e, infine, favoriscono la risposta mediata dai linfociti *T helper 2* (Th2) rispetto ai *T helper 1* (Th1). Inoltre, le MSC deprimono l'immunità umorale, sopprimendo la proliferazione, la chemiotassi e la produzione di anticorpi da parte delle cellule B (2). L'effetto immunosoppressivo delle MSC è stato dimostrato anche *in vivo* in alcuni modelli animali sperimentali di trapianto solido e nell'uomo, in alcune malattie autoimmuni (3).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto dell'infusione delle MSC sulla funzione renale e sul danno istopatologico del rigetto acuto del trapianto di rene nel ratto (4). Ratti Fisher sono stati utilizzati come donatori di rene, ratti Lewis sono stati usati come riceventi e ratti Sprague-Dawley transgenici per l'espressione di eGFP sono stati utilizzati come donatori di MSC. Per il modello del trapianto singenico, i reni dei ratti Lewis RT1 sono stati trapiantati in ratti Lewis RT1. Per il modello del trapianto allogenico i reni dei ratti Fisher F344 sono stati trapiantati in ratti Lewis RT1. Tutti i riceventi hanno subito una nefrectomia bilaterale immediatamente prima del trapianto.

Sono stati studiati 4 gruppi di ratti. Gruppo A: ratti con trapianto singenico hanno ricevuto nell'arteria renale soluzione

fisiologica subito dopo la riperfusione. Gruppo B: ratti con trapianto singenico hanno ricevuto PBS contenente 3×10^6 MSC subito dopo la riperfusione. Gruppo C: ratti con allotrapianto hanno ricevuto soluzione fisiologica. Gruppo D: ratti con allotrapianto hanno ricevuto PBS contenente 3×10^6 MSC. Non è stata somministrata alcuna terapia immunosoppressiva. I ratti di ciascun gruppo sono stati sacrificati al giorno 7 e i reni sono stati prelevati per gli studi istomorfologici. Durante lo studio, non è stata osservata alcuna differenza significativa nel peso corporeo e nell'assunzione di acqua e cibo tra i quattro gruppi di ratti. L'iniezione di MSC non si è associata a nessuna apparente compromissione delle funzioni vitali, a dispnea o alla morte.

La filtrazione glomerulare, misurata dalla *clearance* della creatinina, è mostrata nella Figura 1. Prima del trapianto, la *clearance* della creatinina era normale e simile nei quattro gruppi, tra 1.6 ± 0.2 mL/min nei ratti singenici non trattati (gruppo A) e 1.5 ± 0.4 mL/min nei ratti con allotrapianto trattati con MSC (gruppo D). Dopo il trapianto, la filtrazione glomerulare era simile nei ratti singenici trattati e non trattati.

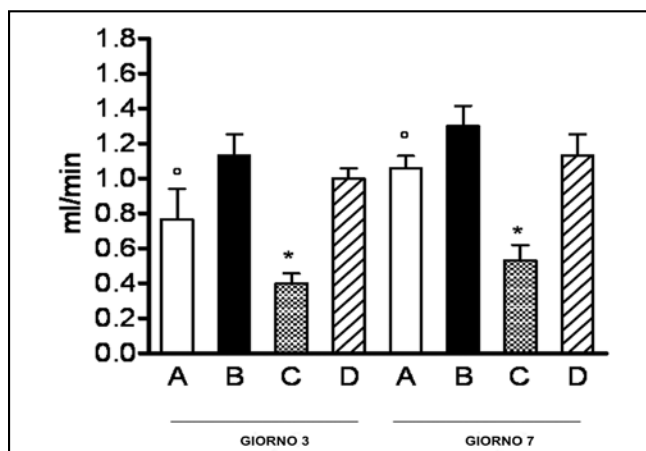


Fig. 1 - Clearance della creatinina dopo 3 e 7 giorni dal trapianto. Le colonne rappresentano le medie, mentre le barre rappresentano le deviazioni standard. A: trapianti singenici trattati con soluzione salina, B: trapianti singenici trattati con MSC, C: trapianti allogenici trattati con soluzione salina e D: trapianti allogenici trattati con MSC.

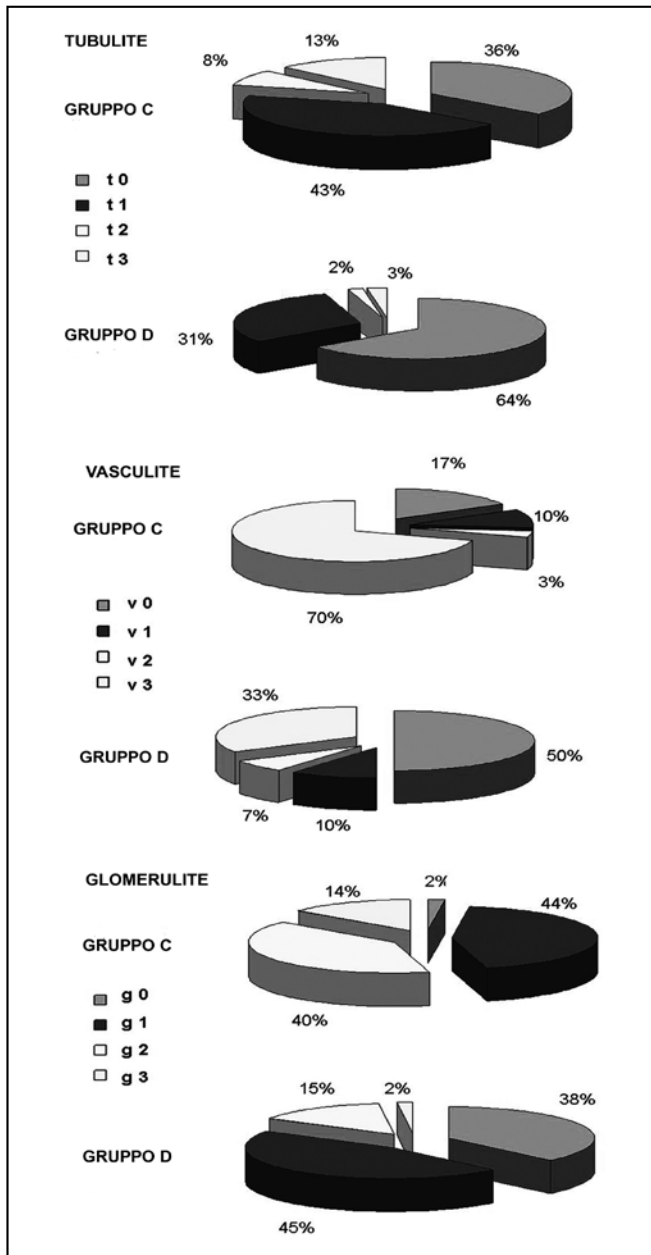


Fig. 2 - I gruppi sono stati definiti nella Figura 1. Scores della tubulite. Percentuali dei tubuli con score t0, t1, t2 e t3 al giorno 7. Gli scores sono stati definiti secondo la Classificazione di Banff. C p<0.001 vs D. Scores della vasculite. I gruppi sono stati definiti nella Figura 1. Percentuale delle arterie con score v0, v1, v2 e v3 al giorno 7. Gli scores sono stati definiti secondo la Classificazione di Banff. C p<0.0001 vs D. Scores della glomerulite. I gruppi sono stati definiti nella Figura 1. Percentuale di glomeruli con score g0, g1, g2 e g3 al giorno 7. Gli scores sono stati definiti secondo la Classificazione di Banff. C p<0.0001 vs D.

Nei ratti con trapianto allogenico trattati con MSC, la clearance della creatinina era significativamente più alta che nei ratti non trattati. Nei ratti sottoposti ad allotrapianto, ma non nei ratti sottoposti a trapianto singenico, erano presenti tubulite, vasculite e glomerulite. Tuttavia, l'infusione di MSC preveniva il danno da tubulite; infatti, nei ratti trattati, il 64% dei tubuli non mostrava un infiltrato infiammatorio, rispetto al 36% dei ratti non trattati. Inoltre, i ratti non trattati presentavano il 21%

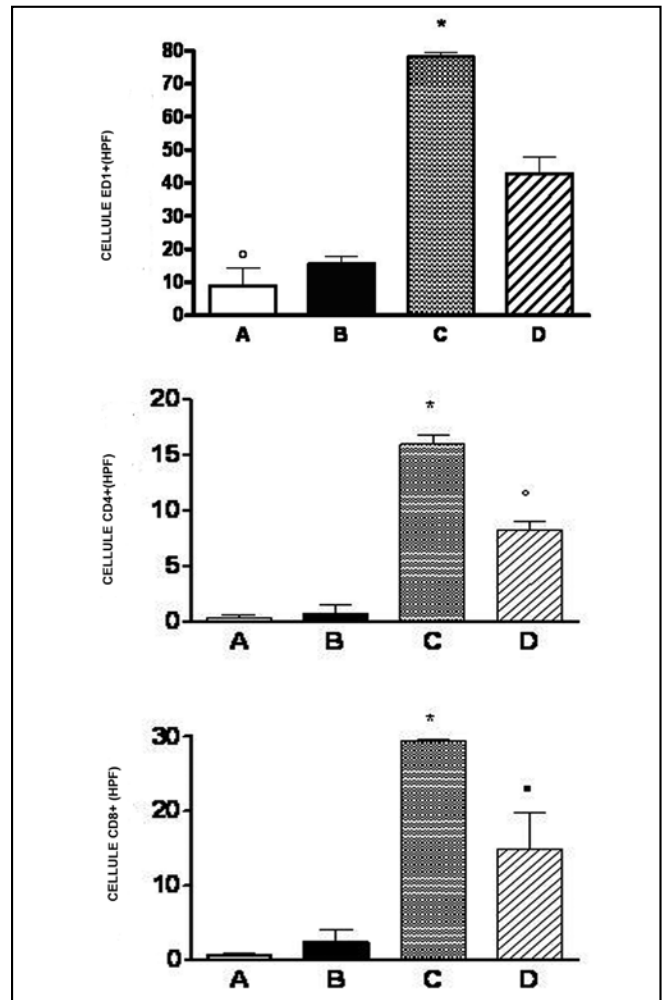


Fig. 3 - I gruppi sono stati definiti nella Figura 1. Infiltrato monocitario. Le colonne rappresentano il numero di cellule ED1 positive X HPF al giorno 7 (media±DS). *p<0.005 vs A, B, D; °p<0.001 vs D. Infiltrato linfocitario CD4. Le colonne rappresentano il numero di cellule CD4 positive X HPF (media±DS) al giorno 7. CD4, *p<0.001 vs A, B, D; °p<0.001 vs A, B. Infiltrato linfocitario CD8. Le colonne rappresentano il numero di cellule CD8 positive X HPF (media±DS) al giorno 7. CD8, *p<0.01 vs A, B, D; °p<0.005 vs A, B.

dei tubuli con score t2/t3 rispetto al solo 5% dei ratti trattati con MSC. Nei trapianti allogenici non trattati, si osservava un grado di vasculite severa, con score 3 nel 70% delle arterie, mentre, nei reni dei ratti trattati con MSC, lo score 3 era significativamente inferiore, pari al 33%. Viceversa, il 17% delle arterie era normale nei ratti non trattati contro il 50% dei ratti trattati con MSC. Anche la glomerulite era significativamente più severa nei trapianti allogenici non trattati con MSC rispetto a quelli trattati. Il 14% dei glomeruli dei ratti non trattati presentava uno score 3 rispetto al 2% dei ratti trattati, mentre il 2% dei glomeruli risultava normale nei ratti non trattati rispetto al 38% dei ratti trattati (Fig. 2).

Il numero di cellule ED-1 positive (monociti) e CD4 e CD8 positive era significativamente minore nei ratti sottoposti al trapianto singenico rispetto a quello riscontrato nei ratti con allotrapianto. Il numero delle cellule infiammatorie infiltranti nei ratti trattati con le MSC era significativamente minore rispetto ai ratti non trattati (Fig. 3). Le cellule EGFP positive riscontrate

in entrambi i gruppi di ratti che hanno ricevuto le MSC erano rarissime (0-5 per un'intera sezione di tessuto renale) ed erano localizzate nei tubuli, nell'interstizio e nel ciuffo glomerulare. Inoltre, nelle sezioni della milza, erano riscontrate 8-10 cellule/campo e, nelle sezioni del polmone, 3-4 cellule/campo.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che le MSC proteggono dal rigetto acuto in un modello di trapianto di rene nel ratto, modulando la risposta immune; tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere i meccanismi alla base dei loro effetti.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI: Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI: Gli Autori dichiarano di non aver ricevuto contributi economici per lo svolgimento dello studio. Gli esperimenti sugli animali sono stati condotti nel rispetto delle norme vigenti.

Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Teresa Rampino
Struttura Complessa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto
Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo
Piazzale Golgi 21
27100 Pavia
e-mail: t.rampino@smatteo.pv.it

BIBLIOGRAFIA

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284 (5411): 143-7.
2. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105 (4): 1815-22.
3. 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. *Lancet* 2008; 371 (9624): 1579-86.
4. De Martino M, Zonta S, Rampino T, et al. Mesenchymal stem cells infusion prevents acute cellular rejection in a rat kidney transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42(4):1331-5.