



UNIVERSITA' degli STUDI di TORINO  
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE  
Dottorato in Fisiopatologia Medica

“Il rigetto anticorpo mediato e la glomerulopatia  
cronica nel trapianto di rene: ruolo protettivo delle  
microvescicole derivanti dalle cellule progenitrici  
endoteliali e impatto clinico degli anticorpi anti-  
recettore tipo 1 dell'angiotensina II”

Relatore

*Chiar.mo Prof. Luigi Biancone*

Candidata

*dott.ssa Stefania Bussolino*

Anno Accademico

2015-2016

## ***INDICE***

	<i>pag.</i>
<b><u>INTRODUZIONE</u></b> .....	6
CAP.1: Cenni sull'evoluzione del trapianto renale.....	7
CAP.2: Rigetto nel trapianto d'organo.....	10
Il rigetto T-cellulo mediato. ....	11
Il rigetto anticorpo mediato.....	11
Fasi del rigetto anticorpo- mediato.....	14
Meccanismi di rigetto anticorpo mediato.....	15
Meccanismi di danno indipendenti dall'attivazione del complemento.....	17
Anticorpi non anti-HLA: focus sugli anticorpi antirecettore tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R-Ab).....	20
CAP 3: Glomerulopatia cronica da trapianto.....	23
Definizione.....	23
Incidenza, fattori di rischio e impatto clinico.....	23
Evoluzione del concetto di cTG nel tempo.....	25
Caratteristiche istologiche e criteri diagnostici della cTG.....	28
Diagnosi bioptica.....	31
Eziopatogenesi della cTG.....	34
CAP.4: Cellule staminali provenienti dal midollo osseo.....	35
Le cellule progenitrici endoteliali.....	36
Meccanismi paracrini coinvolti nella comunicazione cellulare: ruolo delle microvescicole (Mvs).....	38
L'attività biologica delle MV.....	40

Ruolo delle microvescicole.....	43
Vantaggi di utilizzo delle microvescicole.....	44
<b><u>SCOPO DELLO STUDIO</u></b> .....	45
<b><u>MATERIALI E METODI</u></b> .....	46
Descrizione della popolazione selezionata.....	47
Prelievo dei sieri dei pazienti.....	50
Valutazione espressione CD55, CD59 e MAC a livello bioptico.....	50
Isolamento e caratterizzazione delle EPC.....	52
Isolamento e caratterizzazione delle MV originate dalle EPC.....	52
Transfezione delle EPC on antagomiR diretti contro miR-126 e miR-296.....	54
Transfezione delle EPC con siRNA diretti contro CD55,CD59, Fattore H.....	54
Estrazione RNA e analisi RNA mediante Bioanalyzer.....	55
Analisi Real-Time qPCR.....	55
Analisi FACS per valutare l'espressione degli inibitori del complemento a livello proteico nelle EPC.....	56
Isolamento e caratterizzazione delle cellule glomerulari endoteliali (GEC).....	57
Analisi FACS per valutare l'espressione di molecole pro-infiammatorie a livello proteico nelle GEC.....	57
Adesione dei PBMC e delle Natural Killer (NK) sulle GEC.....	58
Analisi proliferazione GEC.....	60
Angiogenesi.....	60
Apoptosi.....	61
Valutazione della presenza di AT1R-Ab e DSA.....	61
Analisi statistica.....	62
<b><u>RISULTATI</u></b> .....	63
<b>PRIMA PARTE DELLO STUDIO</b>	
Descrizione della popolazione .....	63

Valutazione espressione CD55, CD59 e MAC a livello bioptico.....66

## **SECONDA PARTE DELLO STUDIO**

Caratterizzazione delle EPC e delle MV derivanti dalle EPC.....68

Caratterizzazione delle EPC e delle MV per gli inibitori del  
complemento.....69

Internalizzazione delle MV nelle GEC.....70

Ruolo protettivo delle MV sul danno anticorpale complemento-mediato a livello  
delle cellule endoteliali.....72

Angiogenesi in vitro.....75

Analisi dell'effetto anti-apoptotico esercitato dalle MV sulle  
GEC.....76

## **TERZA PARTE DELLO STUDIO**

Descrizione della popolazione.....79

Espressione degli AT1R-Ab.....80

Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione AT1R-Ab positiva.....81

AT1R-Ab e DSA.....82

**DISCUSSIONE**.....86

Conclusioni.....94

**RINGRAZIAMENTI**.....96

**BIBLIOGRAFIA**.....98



## ***INTRODUZIONE***

## ***CAP. 1: CENNI SULL'EVOLUZIONE DEL TRAPIANTO RENALE***

Il trapianto di rene, sia da donatore cadavere che da donatore vivente, è il trapianto d'organo più comune al mondo. Dall'effettuazione del primo trapianto, avvenuto a Boston nel 1954, oltre 500.000 persone nel mondo sono state sottoposte a questa terapia e viene attualmente considerato il trattamento preferenziale per la maggior parte dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale. Rappresenta infatti la forma più completa di terapia sostitutiva essendo in grado di restituire una pressoché normale funzionalità renale e riequilibrando i sistemi endocrino-omeostatici extra-renali alterati dallo stato uremico, consentendo un notevole miglioramento della sopravvivenza del paziente nonché della qualità di vita [1].

Negli anni i trapianti hanno presentato una progressiva evoluzione, da trattamento sperimentale a terapia d'elezione e parallelamente allo sviluppo delle metodiche chirurgiche, si è assistito all'evoluzione di concetti e tecniche essenziali per il successo del trapianto: il rigetto, la sua natura immunologica e i presidi terapeutici dei quali si può disporre. In particolare le innovazioni in campo farmacologico (dall'irradiazione total-body ai nuovi farmaci immunodepressori – m-TORi e anticorpi monoclonali – passando per steroidi, azatioprina, CNI), la disponibilità di nuovi farmaci antifettivi, unitamente al progresso della chirurgia mini-invasiva e della diagnostica tradizionale ed interventistica ed alle scoperte in ambito immunologico, hanno garantito un notevole miglioramento dei risultati clinici. Inoltre si è assistito all'allargamento delle indicazioni al trapianto, con progressivo cambiamento della

tipologia dei donatori e dei riceventi (*extended criteria donors ECD /extended criteria recipients ECR*).

Per quanto l'introduzione di nuovi e sempre più potenti farmaci immunodepressori, a partire dagli anni '90, abbia permesso una significativa riduzione del tasso di incidenza di rigetto acuto, esso rappresenta ancora uno dei determinanti della sopravvivenza del trapianto con conseguenze sia a breve termine che a lungo termine. Nonostante l'evoluzione della terapia immunodepressiva utilizzata e le moderne conoscenze del danno immunologico e non immunologico nel trapianto renale e il notevole miglioramento della sopravvivenza a breve termine dell'organo trapiantato, la sopravvivenza del graft a lungo termine è migliorata negli anni solo marginalmente e risulta significativamente diminuita da diversi fattori tra cui il rigetto rappresenta una delle principali cause [2].

Nel 1936 P. Gorer dimostrò nel topo l'esistenza di un gruppo di antigeni, codificati da geni localizzati in un'area cromosomica specifica (il complesso maggiore di istocompatibilità, MHC), la cui compatibilità fra donatore e ricevente è fondamentale per l'attecchimento del trapianto di cute. Nel 1965 il complesso maggiore di istocompatibilità fu descritto anche nell'uomo, da parte di J. Dausset e J.J. van Rood. Le differenze individuali che sono alla base del fenomeno del rigetto dell'organo trapiantato derivano proprio dall' MHC, il quale è costituito da una serie di geni, localizzati in corrispondenza del braccio corto del cromosoma 6, che codificano la sintesi di alcune glicoproteine di membrana. Queste ultime si dividono in due sottogruppi: il primo corrisponde agli antigeni di classe I (A, B e C), che sono presenti su tutte le cellule mononucleate. Il secondo è rappresentato dagli antigeni di classe II (HLA-DR, DQ e DP), e

sono presenti solo sulla superficie di macrofagi, linfociti B e T attivati, cellule endoteliali e, in alcuni casi, cellule epiteliali. Il microendotelio dei capillari renali è l'unico endotelio all'interno del corpo umano a esprimere costitutivamente antigeni di classe II. Entrambe le classi di antigeni partecipano all'attivazione immunologica cui sono dovuti i fenomeni di rigetto, e costituiscono rispettivamente il bersaglio delle cellule citotossiche (HLA-A, B e C) e dei linfociti T helper (HLA-DR, DQ e DP).

## ***CAP. 2: IL RIGETTO NEL TRAPIANTO D'ORGANO***

Il trapianto di tessuti, organi o cellule da un donatore geneticamente differente dal ricevente induce nel ricevente stesso una risposta immunitaria diretta contro gli alloantigeni del graft. Se non controllata, tale risposta può distruggere il graft [3]. In base al momento in cui insorge il rigetto può essere classificato in iperacuto, acuto o cronico [4].

Il *rigetto iperacuto*, avviene entro pochi minuti dalla rivascularizzazione dell'organo trapiantato, manifestandosi con la trombosi dei vasi dell'organo. È dovuto ad anticorpi preformati che legano gli antigeni dell'endotelio vascolare ed è solitamente complemento mediato. .

Il *rigetto acuto accelerato* insorge entro poche ore o giorni dal trapianto mediato dalla presensibilizzazione dovuta alla presenza di anticorpi anti-HLA.

Il *rigetto acuto*, che si manifesta entro pochi giorni dal trapianto ma anche a distanza di anni, può essere di tipo vascolare o cellulare.

Il *rigetto cronico* insorge nel giro di mesi o anche di anni dal trapianto ed è anch'esso mediato da meccanismi immunitari diretti contro il graft da parte di linfociti T e/o anticorpi.

Recentemente è stata identificata un'altra categoria di rigetto, il *rigetto subclinico*, nella quale rientrano quadri caratterizzati da danno istologico mediato da anticorpi o da cellule T, a cui non corrisponde un significativo peggioramento funzionale.

Il rigetto è inoltre classificato, in base ai meccanismi immunologici sottostanti in rigetto anticorpo e T-cellulo

mediato.

### **Il rigetto T-cellulo mediato**

Il rigetto T-cellulo mediato (TCMR) è una reazione immunitaria linfocitaria (cellulo-mediata) diretta contro gli antigeni del donatore [4].

Istologicamente è caratterizzato dall'infiltrazione dell'interstizio dell'organo trapiantato da parte di linfociti T del ricevente e di macrofagi che inducono il danno dell'organo.

Nel graft l'elemento caratteristico è proprio il riscontro di infiltrati di linfociti T effettori del ricevente e di cellule presentanti l'antigene del donatore che creano una zona di infiammazione locale.

### **Il rigetto anticorpo mediato**

L'interazione degli anticorpi anti-donatore con le cellule target del ricevente può dar luogo a tre situazioni differenti: sviluppo di lesioni acute, sviluppo di lesioni croniche o uno stato di "accomodazione", cioè una sorta di resistenza locale all'attività degli anticorpi e del complemento [5]. Lo sviluppo delle lesioni croniche, piuttosto che di quelle acute, è un processo biologico specifico che deriva dall'innescamento di meccanismi ancora scarsamente noti nelle cellule endoteliali e nelle cellule muscolari lisce dei vasi.

Il rigetto acuto, che per anni è stato considerato un processo unicamente mediato dai linfociti T, in realtà può essere provocato anche dagli anticorpi sia esistenti a basso titolo prima

del trapianto che neoformati dal ricevente in seguito all'intervento.

Secondo la classificazione di Banff, le condizioni necessarie per definire il rigetto acuto anticorpo-mediato (AMAR) sono tre [6]. La prima è l'evidenza di un insulto tissutale acuto nell'organo, che si può presentare, di solito, come una lesione compatibile con un danno tubulare acuto o come un'infiltrazione di neutrofili o cellule mononucleate nei capillari peritubulari (PTC). La seconda condizione è l'evidenza di un coinvolgimento anticorpale, riscontrabile come deposito di C4d oppure come presenza di anticorpi nell'area necrotica o, più raramente, nei PTC. La terza condizione è la presenza di anticorpi circolanti diretti contro gli antigeni HLA del donatore o contro altri antigeni endoteliali.

Mentre l'attenta allocazione degli organi e una terapia immunosoppressiva adeguata hanno permesso di eliminare quasi del tutto l'incidenza del rigetto iperacuto e di ridurre in maniera consistente quella dell'AMAR, per quanto riguarda il rigetto cronico i progressi fatti per prevenire questa importante causa di perdita prematura del rene trapiantato sono ancora pochi. I meccanismi che portano al rigetto cronico rimangono, infatti, ancora incerti, anche se è noto che fattori sia immunologici che non immunologici ne siano responsabili.

Le prime segnalazioni della possibile relazione tra rigetto e immunità umorale risalgono agli anni 70: è in quegli anni che Jeannot M e al. osservarono una correlazione tra comparsa di arteriolopatia cronica e presenza nel siero di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) prodotti de novo e che Kissmeyer-Nielsen e al. ipotizzarono una possibile correlazione esistente tra immunità umorale e rigetto iperacuto. Successivamente Halloran

et al. [7] rinnovarono l'attenzione verso la risposta anticorpale anti-donatore dimostrando che lo sviluppo de novo di anticorpi DSA anti-HLA era in grado di condizionare negativamente la sopravvivenza del rene trapiantato, avanzando l'ipotesi che il danno d'organo fosse mediato dall'attivazione del sistema complementare e dai granulociti neutrofili. Solo alla fine degli anni '90 poi si sono identificati dei markers biotici e sierologici applicabili alla normale routine trapiantologica, documentando la validità della rilevazione del fattore del complemento C4d nelle biopsie renali come marker di rigetto anticorpo-mediato [8].

L'attività sul graft di anticorpi DSA è infatti alla base dello sviluppo del rigetto anticorpo-mediato. Per la maggior parte dei casi, la specificità degli anticorpi è diretta verso epitopi presenti nelle molecole di MHC del donatore.

La presenza di anticorpi rivolti contro antigeni non-HLA, la maggior parte dei quali identificabili sulle cellule endoteliali e sui monociti, è stata riscontrata per la prima volta nell'ambito di trapianti di rene HLA identici, indicando che anche gli antigeni non-HLA possono determinare l'insorgenza di rigetti acuti [49]. Studi su trapianti da donatore vivente consanguineo hanno dimostrato che la presenza di IgM reattive nei confronti dell'endotelio e dei monociti correlava con rigetti acuti e perdita del graft [50]. In considerazione del fatto che la sola risposta umorale HLA correlata non è in grado di spiegare tutti i rigetti acuti anticorpo-mediati l'attenzione della ricerca è sempre più rivolta anche verso lo studio degli antigeni non-HLA correlati in grado di stimolare risposte anticorpali nel ricevente, come la vimentina, l'actina, la tubulina, il recettore tipo 1 dell'angiotensina II e gli antigeni eterogenei contro cui è rivolta

la risposta degli anticorpi contro le cellule endoteliali (AECA, anti-endothelial cell antibodies) [51].

Gli anticorpi anti-cellule endoteliali, noti da più di 30 anni [52] sono stati inizialmente identificati come autoanticorpi coinvolti in una grande varietà di patologie immunomediate e connettiviti sistemiche quali la malattia di Kawasaki, le vasculiti dei piccoli vasi [53], la vasculite reumatoide [54] ed il lupus eritematoso sistemico [55]. Effettivamente essi non rappresentano un'entità univoca, bensì un gruppo eterogeneo di anticorpi diretti contro una varietà di determinanti antigenici situati sulla superficie delle cellule endoteliali

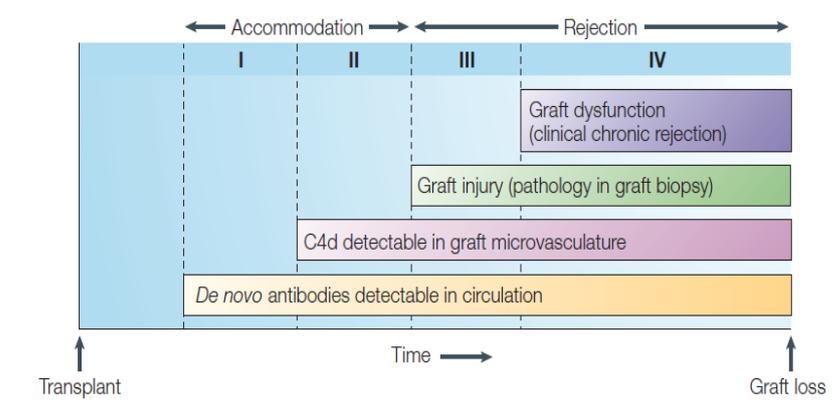
In uno studio del 2003 Terasaky et al il 38% di perdita del graft per cause immunologiche dipendeva da anticorpi non anti HLA a fronte di un 18% invece correlabile a anticorpi anti HLA [8].

L'endotelio infatti rappresenta il primo tessuto del donatore che entra a contatto con il sistema immunitario del ricevente. I possibili target antigenici sono numerosi, in primis gli MHC class I-related chain A e B (MIC-A e MIC-B) [10], il recettore di tipo I dell'angiotensina II (AT1R) [11], gli anticorpi anti-vimentina [12]. Gli AECA causerebbero un danno endoteliale sia attraverso una citotossicità complemento mediata che inducendo l'attivazione delle cellule endoteliali, inducendo apoptosi.

### **Fasi del rigetto anticorpo-mediato**

Una recente Consensus Conference dell'Istituto Nazionale di Sanità degli Stati Uniti ha identificato quattro fasi di sviluppo del rigetto anticorpo-mediato (Figura 1). Secondo tale modello, la prima fase (fase I) [16] è caratterizzata proprio dallo sviluppo

di anticorpi rivolti verso determinati antigenici del donatore. Nella fase successiva (Fase II) gli anticorpi causano l'attivazione del complemento con conseguente deposizione di C4d a livello endoteliale sia peritubulare che glomerulare. Sia nella fase I che nella fase II è possibile si instauri il meccanismo di accomodazione (descritta più avanti) e gli anticorpi non provochino quindi necessariamente danno clinico e lesioni istologiche. Nella fase III è possibile individuare le tipiche alterazioni istologiche ma la funzionalità renale è ancora normale (il cosiddetto rigetto subclinico). E' solo nell' ultima fase (fase IV) che si riscontrano le alterazioni della funzionalità renale intese sia come aumento della proteinuria che della creatinina.



**Figura 1:** fasi del rigetto anticorpo mediato (Colvin et al., Nature Reviews 2005; 5:807-817)

### **Meccanismi di rigetto anticorpo-mediato**

La fissazione del complemento da parte degli anticorpi è essenziale nella patogenesi del rigetto anticorpo-mediato [17].

#### Attivazione del complemento

L'attivazione del C1, composto da diverse subunità C1q, C1r e C1s, inizia dall'interazione di C1q con le IgG o IgM fissate a un antigene espresso dall'endotelio. Il legame di C1q alle immunoglobuline attiva il C1r che a sua volta attiva il C1s. Il C1s attiva a sua volta il C2 e il C4, scindendo enzimaticamente il C4 in due frazioni: il C4a che rimane in circolo nel plasma e il C4b che si lega covalentemente alla membrana garantendo che l'attivazione prosegua solo in presenza di antigeni o con l'immunocomplesso. Il fattore I permette l'inattivazione di C4b a C4d, che rimane covalentemente legato al tessuto rappresentando in marker duraturo della deposizione degli anticorpi e dell'attivazione del complemento, diversamente dal deposito di C1q.

Se l'attivazione complementare non procede, vi può essere deposizione di C4d a livello endoteliale in assenza del danno istologico. Se il C4d si combina con il frammento C2a, formando il complesso C4b2a che costituisce l'enzima chiamato C3 convertasi della via classica, capace di legarsi al C3 e di scinderlo in due subunità C3a e C3b. Quest'ultima, legandosi al complesso C4b2a, va a costituire la C5 convertasi. Le C5 convertasi originate innescano l'attivazione delle componenti finali del sistema del complemento, che conducono alla formazione del **MAC** (*Membrane Attack Complex*, definito come C5b-C9) [13] e alla lisi della cellula. La proteolisi dei componenti C3, C4 e C5 genera i relativi frammenti b che si assemblano tra loro nelle varie fasi di attivazione del complemento e i frammenti C3a, C4a e C5a, detti anafilotossine. Queste inducono l'infiammazione fissandosi ai relativi recettori di membrana presenti su mastociti, granulociti, monociti e sulle cellule endoteliali. A livello endoteliale incrementano l'espressione di molecole di adesione come le selectine (E-

selectina), molecole di adesione (VCAM1 e ICAM1), citochine e chemochine quali l'interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-6, CCL5 (conosciuta anche come RANTES) e CXC-chemokine ligand 8 (CXCL8; anche noto come IL-8) [18].

Il MAC inoltre attiva la proliferazione della cellula endoteliale, come è dimostrato dal rilascio di fattori di crescita quali il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF), a la produzione di chemochine e molecole proinfiammatorie CCL2, CCL5 e CXCL8.

### **Meccanismi di danno indipendenti dall'attivazione del complemento**

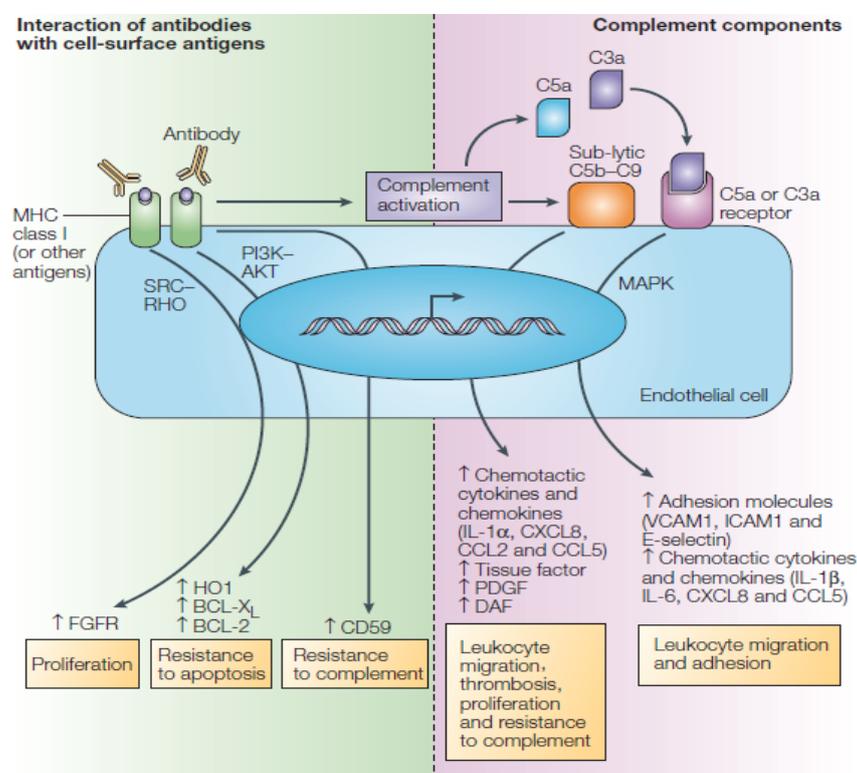
L'azione degli anticorpi a livello endoteliale può essere anche indipendente dall'attivazione del complemento in particolare per quanto riguarda il rigetto anticorpo mediato cronico. Infatti anche anticorpi non in grado di fissare il complemento sono capaci di indurre rigetto verosimilmente con meccanismo diretto o con citotossicità anticorpo-dipendente mediata da macrofagi e cellule NK [15, 19] Gli anticorpi possono provocare lisi delle cellule target attraverso ad esempio legame con il recettore a bassa affinità Fc delle IgG sulla superficie di NK e macrofagi (processo noto come citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente, ADCC).

### Proteine anti-apoptotiche

La resistenza del graft al danno anticorpale e all'attivazione del complemento è permesso dall'espressione a livello endoteliale di proteine cito-protettive. In modelli murini di xenotrapianto che sviluppano accomodazione aumenta l'espressione della proteina

antiapoptotica BCL-2, BCL-XL e haem oxygenase 1 (HO1)97 (Figura 2) [20]

L'aumento dell'espressione di BCL-XL è riscontrabile a livello dell'endotelio di trapianti di rene con la presenza di DSA circolanti, e l'espressione può essere indotta in colture di cellule endoteliali stimulate sempre da anticorpi anti HLA. Anche l'espressione genica di pazienti accomodanti è differente.



**Figura 2** :Effetti dell'attivazione del complemento da parte degli anticorpi a livello endoteliale (Colvin et al., Nature Reviews 2005; 5:807-817)

### Meccanismi di regolazione del complemento

Sono principalmente quattro gli inibitori della via classica e alternativa del complemento che sono stati identificati nell'uomo. Tre di questi CR1, CD55 (o DAF-decay

accelerating factor) e CD46 (o MCP-membrana cofactor protein), inibiscono entrambe le vie a livello della C3 convertasi e della C5 convertasi. Il CD59 è una proteina regolatoria che inibisce invece il MAC.

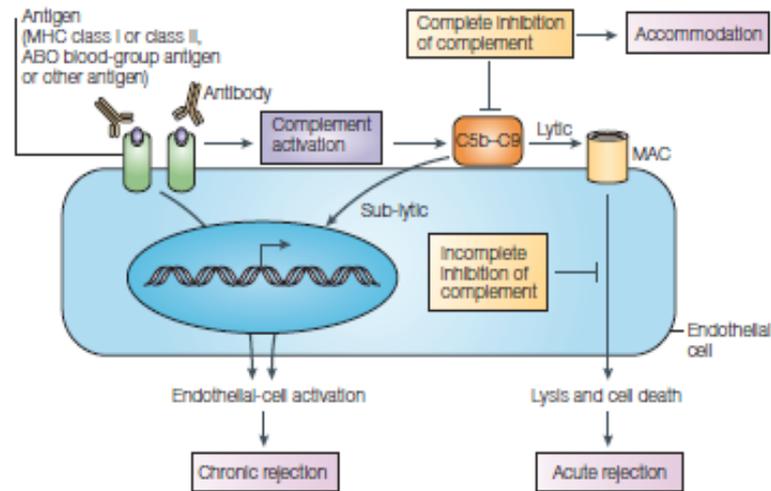
Anche il fattore H svolge un ruolo chiave nella regolazione della via alternativa del complemento e un suo deficit è associato a diverse patologie tra cui la sindrome emolitico-uremica, la glomerulonefrite membranosa-proliferativa, la nefropatia lupica nonché nel rigetto. La mancanza del fattore H determina un'attivazione massiva del C3 con deposito a livello glomerulare.

Nell'uomo a livello dell'endotelio capillare del rene sano queste molecole sono espresse a livello così minimo da non essere rilevabili; il CD59 è invece espresso a livelli variabili [21]. Pertanto l'attivazione del complemento è poco ostacolata.

L'espressione di DAF a livello di colture endoteliali è incrementata in presenza di trombina o del fattore di crescita vascolare, attraverso una via dipendente dalle proteina chinasi C. L'espressione di DAF è inoltre stimolata dalla presenza di TNF, IFN- $\gamma$ , C5b-C9 o bFGF, attraverso una via indipendente alla proteina chinasi C [22]. Queste stesse molecole non vanno a influire invece sull'espressione di CD59 o del MAC.

Gli anticorpi possono stimolare l'espressione di proteine che regolano il complemento. L'aumento dell'espressione di CD59 da parte delle cellule endoteliali è riscontrabile in caso di rigetto acuto o cronico, mentre l'espressione di DAF è maggiormente conseguente a rigetto cronico anticorpo-mediato. Sebbene questo tipo di risposta al danno anticorpale può contribuire alla riparazione del danno endoteliale in caso di rigetto acuto, è comunque inadeguato a prevenire l'insorgenza di danno cronico.

Infatti l'accomodazione è permessa solo in casi di completa inibizione del complemento [14, 23].



**Figure 3:** Possibile evoluzione del legame anticorpo-entotelio (Colvin et al., Nature Reviews 2005; 5:807-81)

### **Anticorpi non anti-HLA: focus sugli anticorpi antirecettore tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R-Ab)**

Il recettore tipo 1 dell'angiotensina II appartiene alla famiglia tipo A dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR) ed è responsabile della maggior parte delle azioni fisiologiche dell'angiotensina II, incluso la la regolazione della pressione arteriosa e il bilancio idro-salino.

Gli anticorpi rivolti verso il recettore tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R-Ab) appartengono alla sottoclasse di immunoglobuline IgG1 e IgG3 e riconoscono la porzione antigenica del recettore collocata a livello extracellulare. Il legame degli anticorpi induce l'amplificazione del segnale a livello dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce, coinvolto nel danno vascolare di tipo infiammatorio.

AT1RAb sono gli unici tra gli anticorpi non-HLA di cui è stato dimostrato un ruolo nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa – in particolare l'ipertensione maligna- la preeclampsia e la sclerosi sistemica [63] Il target antigenico è polimorfo ed è espresso a livello dell'endotelio vascolare e può essere indotto e ne può essere aumentata l'espressione in occasione di eventi infiammatori. Il legame degli anticorpi induce l'amplificazione del segnale a livello dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce, coinvolto nel danno vascolare. Già il danno da ischemia-riperfusion può di per se causare uno stress ossidativo che può agire alterare l'endotelio vascolare aumentandone la suscettibilità all'attacco da parte degli AT1R-Ab. Questi ultimi possono poi, a loro volta, amplificare lo stato infiammatorio aumentando l'espressione antigenica a livello locale e la produzione di citochine Th1 e chemochine infiammatorie.

AT1R-Ab possono svilupparsi in modo analogo a quello degli anticorpi anti HLA e quindi in seguito a trasfusioni di sangue, gravidanze e precedenti trapianti. Possono inoltre emergere in seguito a riduzione del carico immunodepressivo o per non-compliance.

Numerosi studi in letteratura hanno riportato l'associazione tra AT1R-Ab e sviluppo di rigetto acuto anticorpo mediato. Inoltre è stato dimostrato che questi anticorpi non-HLA possono contribuire direttamente alla disfunzione del graft [64-68]

Il meccanismo immunologico è simile a quello osservato in gravidanze con preeclampsia complicata da ipertensione, sebbene gli epitomi riconosciuti parrebbero essere differenti.

E' stato inoltre riportato un effetto sinergico tra gli AT1R-Ab e i DSA di classe II nel rigetto acuto anticorpo mediato.

## ***CAP. 3: LA GLOMERULOPATIA CRONICA DA TRAPIANTO***

### **Definizione**

La glomerulopatia cronica da trapianto (cTG) è una sindrome clinica caratterizzata dalla comparsa di un progressivo peggioramento della funzionalità renale, spesso accompagnato dalla presenza di proteinuria, nella maggior parte dei casi in range nefritico, e di ipertensione arteriosa (Husain 2013; Layla Kamal 2015). L'insorgenza della cTG è molto variabile nel storia post trapianto. Infatti si presenta generalmente a circa 1 anno dal trapianto, ma possono esserci casi più precoci e altri molto tardivi.

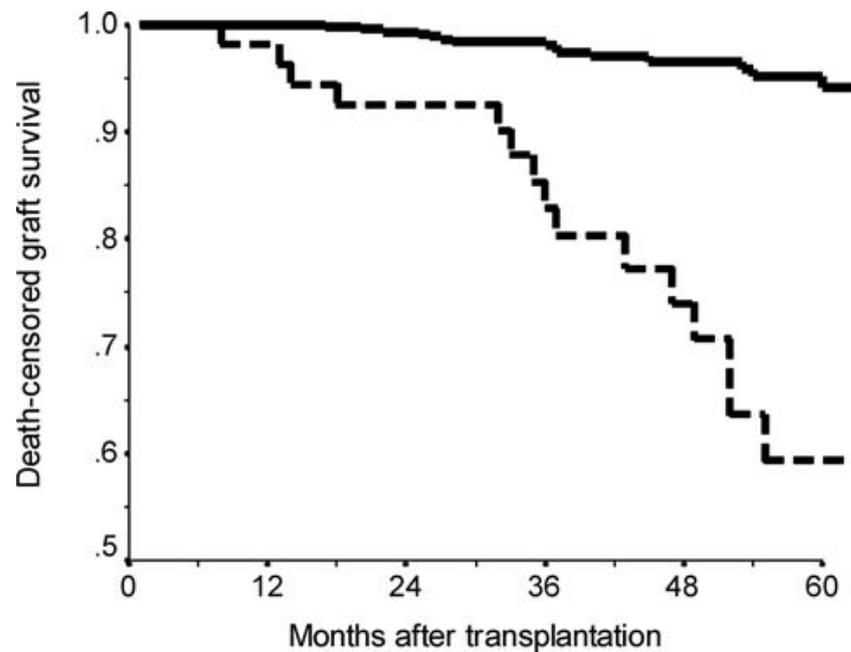
Morfologicamente viene descritta come una estesa duplicazione delle membrane basali glomerulari con ampliamento della matrice mesangiale, in assenza di altra glomerulopatia de novo o ricorrente (Husain 2013). L'interesse nel confronto della cTG sta aumentando poiché nelle casistiche Internazionali è la principale causa di perdita d'organo, se si esclude il decesso del ricevente con rene funzionante.

### **Incidenza, fattori di rischio ed impatto clinico**

Negli ultimi decenni, grazie all'introduzione di schemi immunosoppressivi sempre più potenti, si è assistito ad un miglioramento della sopravvivenza del trapianto renale a breve e medio termine. Tuttavia, questo vantaggio non si mantiene a lungo termine e, come accennato, la cTG ha un ruolo

determinante in tale contesto. (Schinstock 2014; Kamal 2015) (Figura 4).

**Figura 4:** Sopravvivenza nel post trapianto di rene tra i pazienti con cTG (linea tratteggiata) ed in quelli senza cTG (linea continua). (Cosio 2008)



Il picco di incidenza della cTG è molto variabile nelle diverse casistiche. Il motivo può essere identificato in diversi fattori, tra cui la differente politica biotica dei vari centri, la differente prevalenza di pazienti con aumentato rischio immunologico (ritrapianti, iperimmuni, ecc.) e i diversi protocolli di rilevazione degli anticorpi anti- HLA. La prevalenza della cTG è di circa il 20% a cinque anni, ma in letteratura si trovano casistiche con tempo di diagnosi della cTG medio di quasi 3 anni o più di 8 (Cosio 2008; Husain 2013). Generalmente è poco diagnosticata nel corso del primo anno dopo il trapianto.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di cTG sono lo sviluppo di anticorpi antiHLA, che avviene nel 20- 30 % dei

pazienti trapiantati (Colvin RB 2007), ed una storia positiva per rigetto anticorpo mediato (Sis 2009; Shimizu 2009; Husain 2013).

Ulteriori fattori favorenti sembrano essere l'infezione per HCV e la microangiopatia trombotica, ma la letteratura non è concordante in merito.

### **Evoluzione del concetto di cTG nel tempo**

La glomerulopatia cronica da trapianto è una condizione patologica riconosciuta da più di 40 anni, ma che solo negli ultimi dieci anni ha acquisito importanza, parallelamente all'aumento delle conoscenze su questa patologia. E' stata per la prima volta ampiamente descritta da vari autori negli anni '70 (Porter 1967; Busch 1971; Olsen 1974; Cameron e Turner 1977) in seguito ad osservazioni tramite microscopia elettronica di biopsie eseguite sul rene trapiantato. Questi primi studi clinicopatologici hanno dimostrato che la cTG può essere identificata come la via finale comune di un progressivo danno a livello dei capillari.

Secondo le prime teorie anatomopatologiche, la lesione precoce della cTG sarebbe un danno acuto dei capillari del flocculo con rigonfiamento endoteliale; tale aspetto spesso si assocerebbe ad aumentata cellularità glomerulare (Hindawi 2014). Successivamente, numerosi studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che il danno endoteliale è esteso non solo ai capillari glomerulari, ma anche a quelli peritubulari, che mostrano la membrana basale reduplicata. Questa multilaminazione è presente in più del 90% dei casi di cTG, dando l'aspetto di una vera e propria pancapillarite del rene trapiantato (Cosio 2008).

Ulteriori studi hanno supposto che la cTG sia una manifestazione del rigetto cronico anticorpo mediato. Uno dei primi in merito è stato quello condotto su un modello murino dal gruppo del Dr. Paul. Secondo gli Autori, la cTG è il risultato di un danno dovuto ad anticorpi anti glomerulari. Queste ipotesi furono poi supportate dalla dimostrazione su modelli umani della deposizione di C4d a livello dei capillari peritubulari e in una piccola percentuale di casi a livello glomerulare (Schinstock 2014; Rempert 2015).

Studi successivi hanno identificato gli anticorpi anti-HLA, in modo particolare quelli donatore specifici, tra quelli principalmente coinvolti nello sviluppo di cTG (Ivanyi 2003; Rempert 2015). In un'analisi svolta sulle biopsie di sorveglianza effettuate un anno dopo il trapianto, si è notato che la cTG era presente nel 22% dei pazienti con anticorpi anti-HLA donatore specifici rispetto all'8% degli altri pazienti (Husain 2013). Inoltre, è stato evidenziato un rischio elevato di cTG nei soggetti con pregresso rigetto acuto anticorpo-mediato; di questi il 45% sviluppa tale lesione rispetto al 6% riscontrato nei controlli (Husain 2013).

Tuttavia non tutti gli anticorpi compartano un ugual rischio di cTG, l'uso di nuovi e più sofisticati sistemi di ricerca ha infatti mostrato una forte associazione con gli anticorpi anti-HLA di classe II. Tale associazione potrebbe almeno in parte spiegare il netto peggioramento della prognosi renale osservato nei pazienti con anticorpi anti-HLA particolarmente se di classe II (Cosio 2007; Layla Kamal 2015).

Un altro importante interrogativo irrisolto è il ruolo patogenetico di tali anticorpi. A seguito della scoperta della presenza di depositi di C4d nel rigetto umorale sembrava evidente che la triade complemento - rigetto - cTG fosse inscindibile; tale

paradigma è stato tuttavia ampiamente smentito. Le ultime versioni della classificazione di Banff hanno infatti sdoganato l'esistenza del rigetto umorale in assenza di C4d, parimenti è ormai noto che meno del 50% dei casi di cTG ha il C4d alla diagnosi (Layla Kamal 2015). Questi dati si allineano a svariate evidenze che hanno dimostrato come l'insulto anticorpo mediato non è sempre collegato alla presenza di deposizione di C4d (Sis B 2009, Torres 2014). In aggiunta, molti studi hanno mostrato che la deposizione del complemento non è l'unico elemento patogenetico del danno anticorpale del rigetto umorale; anche anticorpi non in grado di fissare il complemento sono capaci di indurre un danno tissutale, sia con meccanismo diretto sia per citotossicità anticorpo-dipendente mediata da macrofagi e cellule NK (Hidalgo LG et al, 2010).

La storia dell'inquadramento nosologico della cTG riflette l'evoluzione delle conoscenze del ruolo degli anticorpi e del complemento nel trapianto di rene e la confusione esistente tra le varie lesioni associate alla comparsa di Ab anti-HLA.

Inizialmente le classificazioni istologiche non distinguevano tra cTG dalla nefropatia cronica da trapianto, entità famosa e ormai desueta (Banff 97).

Con la classificazione di Banff del 2005 la glomerulopatia cronica da trapianto è stata considerata una forma di rigetto cronico anticorpo mediato (Banff 2005, Solez 2007).

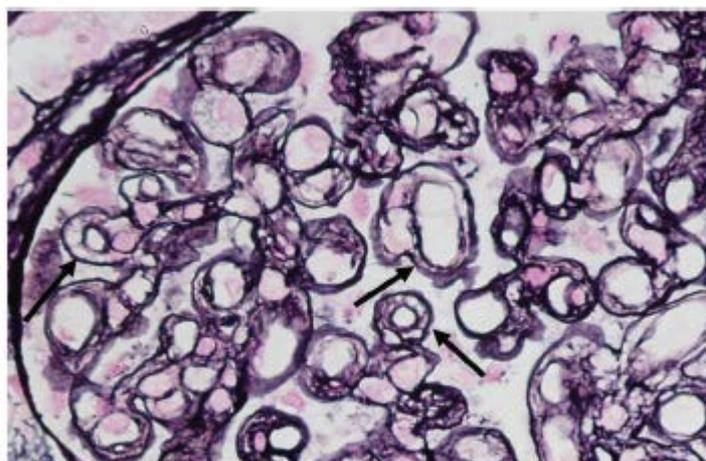
Va precisato che il concetto di cronicità non è legato a una valutazione temporale in quanto entrambe queste lesioni possono insorgere precocemente anche a pochi mesi dal trapianto ed hanno andamento evolutivo. Successivamente sono stati finalmente definiti i criteri diagnostici di cTG (Banff 2007): questi risultavano almeno in parte indipendenti dalla presenza del rigetto. Con i lavori del gruppo di Edmonton, in seguito

confermati in diverse casistiche, (Fotheringham 2009; Mark Hass 2013; Layla Kamal 2015), la cTG è stata classificata in relazione alla presenza di 4 componenti “la cosiddetta “ABCD tetrad” (A) anticorpi anti-donatore, (B) membrana basale dei capillari con aspetto multilamellare, (C) Cd4 e (D) la duplicazione della membrana basale glomerulare). Nella nuova classificazione Banff del 2013, viene nuovamente definita come una forma di rigetto cronico anticorpo mediato “attivo”.

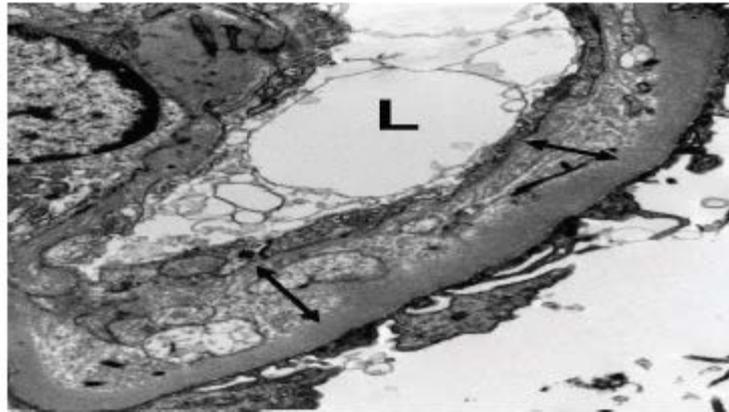
### **Caratteristiche istologiche e criteri diagnostici della glomerulopatia cronica da trapianto**

La biopsia renale è il golden standard per la diagnosi di cTG, per la quantità e la qualità di informazioni che è in grado di fornire. La cTG include una costellazione di caratteristiche istologiche visualizzabili in parte al microscopio ottico e in parte al microscopio elettronico. Le figure 5, 6, 7 mostrano alcuni degli aspetti anatomopatologici di maggior rilievo.

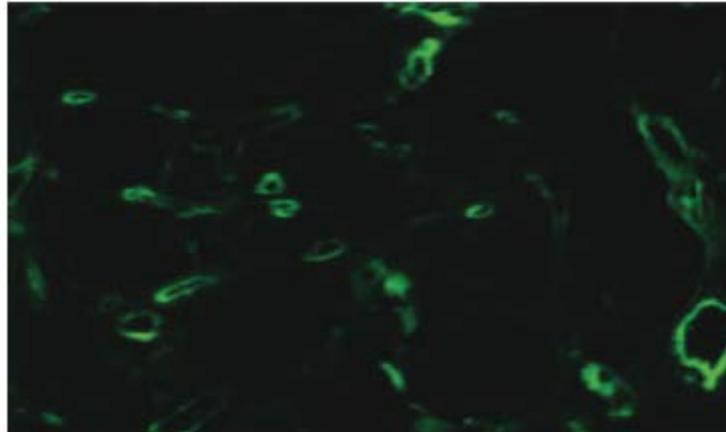
**Figura 5:** cTG: aspetto a doppio contorno delle membrane basali dei capillari glomerulari. (Hanf 2014)



**Figura 6:** cTG: sdoppiamento diffuso delle membrane basali glomerulari, con componente essudativa: granulociti e monociti nelle anse (microscopio elettronico). (Hanf et al, 2014)



**Figura 7:** cTG: intensa positività del C4d sui CPT e sulle anse glomerulari (tecnica immunofluorescenza) (Hanf 2014)



Come evidenziato dalla tabella, molte lesioni tipiche della cTG sono una prova indiretta dell'attivazione dell'immunità umorale, come i depositi di C4d sulla parete dei capillari peritubulari e/o glomerulari. (Mark Haas 2013; Schintock 2014). La rigorosa codifica dei criteri diagnostici di cTG elencati nelle tabelle

parrebbe semplificare molto il riconoscimento di tale lesione (Figura 8). Tuttavia la diagnosi di cTG rimane ad oggi molto complessa sia per motivi prettamente istologici sia per problematiche cliniche.

In primo luogo le forme precoci non comportano un sostanziale peggioramento dei dati clinico-laboratoristici che induca il nefrologo a ricorrere alla biopsia; inoltre, qualora venga comunque posta tale indicazione, la diagnosi delle cTG precoci necessita spesso della microscopia elettronica essendo le lesioni molto sfumate.

Queste problematiche sono meno rilevanti per la cTG tardiva; essa infatti si associa maggiormente ad aumenti apprezzabili della proteinuria e/o della creatininemia e risulta spesso evidente già alla microscopia ottica. In particolare è pressoché costante la presenza dell'aspetto a doppio contorno della membrana basale glomerulare.

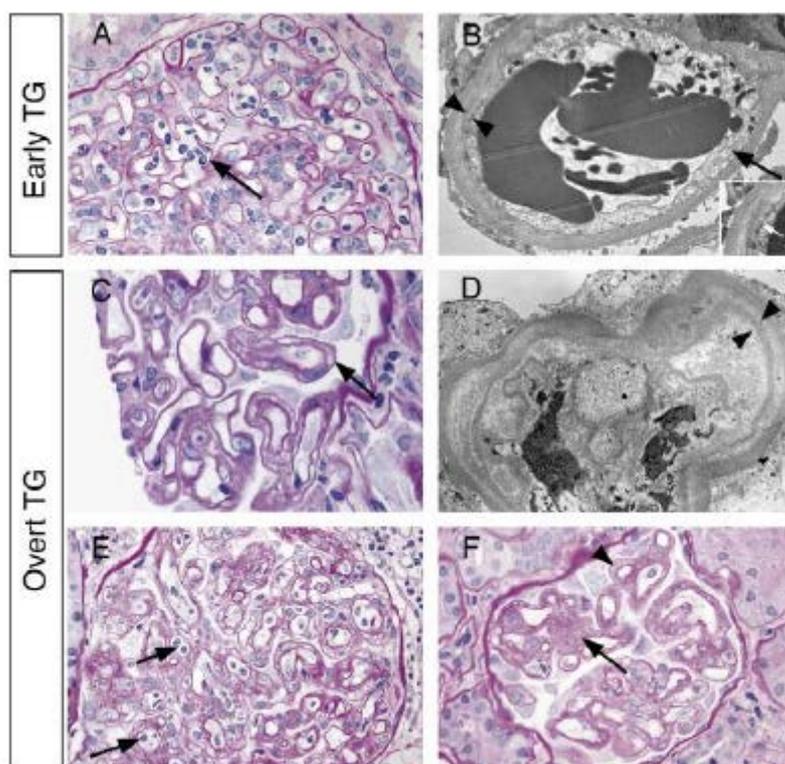
La severità del quadro viene definita sulla base della percentuale di aspetto delle membrane basali a doppio contorno evidenziato a livello del campione bioptico:

- 10%-25% del glomerulo (cg1),
- 26%-50% (cg2),
- più del 50% (cg3) (Banff 2007; Husain 2013).

**Figura 8:**

**Aspetti precoci di cTG:** (A) Glomerulite: glomeruli con infiltrati cellule mononucleate infiammatorie, diagnosticata col microscopio elettronico; (B) duplicazione focale delle membrane basali glomerulari con associata perdita di fenestrazione dell'epitelio capillare.

**Aspetti tardivi della cTG:** (C) Glomeruli con prominente aspetto a doppio contorno, (D) e (E) sdoppiamento diffuso delle membrane basali glomerulari, con componente essudativa: granulociti e monociti nelle anse glomerulari (colorazione PAS), (F) cTG tardiva senza glomeruliti ma con prevalente aspetto a doppio contorno delle membrane basali glomerulari con associata sclerosi segmentale (Husain 2013).



**Diagnosi bioptica**

Le caratteristiche morfologiche della cTG sono in gran parte evolutive e tempodipendenti.

Infatti si pensa che il tempo necessario per lo sviluppo di lesioni evidenti di cTG dipenda dalle caratteristiche del danno endoteliale, e soprattutto dalla persistenza di danni a carico

dell'endotelio glomerulare. La cTG presenta delle lesioni che a secondo del tipo, precoce o tardiva, possono essere non facilmente evidenziabili con la microscopia ottica (MO). La microscopia elettronica (ME) rappresenta un presidio diagnostico fondamentale, soprattutto nelle forme precoci di malattia, quando non vi sono alterazioni al livello della MO.

### **- Microscopia ottica**

La MO rappresenta indubbiamente il presidio diagnostico nelle forme avanzate di cTG, mentre non appare diagnostica nelle forme precoci. In particolare, la cTG precoce inizierebbe come una lesione focale e spesso misconosciuta alla microscopia ottica per l'assenza del doppio contorno delle membrane basali glomerulari. Le forme tardive invece sono ben diagnosticabili in quanto presentano il caratteristico doppio contorno delle membrane basali, spesso associato all'espansione della matrice mesangiale.

Al microscopio ottico, le membrane basali a doppio contorno sono ben visualizzate tramite la colorazione PAS, con acido periodico di Schiff, o con la colorazione argenticca. Il coinvolgimento glomerulare può essere focale o diffuso. La severità delle lesioni viene valutata secondo la classificazione Banff, in base alla percentuale di GBM colpiti.

Gli indicatori morfologici di attività nella al livello microscopico ottico sono rappresentati dalla presenza di segni di infiammazione del microcircolo (capillarite/glomerulite). I mediatori dell'infiammazione sono nella maggior parte dei casi monociti e cellule natural killer, ma partecipano anche i neutrofili e linfociti T rilevati mediante immunisto chimica (Fahim 2007, Hidalgo 2010, Papadimitriou 2010, Sis B 2012 ). Un altro segno di attività nella cTG è rappresentata dalla

presenza di fibrina o microtrombi piastrinici nelle anse capillare, presenti soprattutto nelle fasi precoci di cTG (Maryniak 1985).

#### **- Immunoistochimica**

L'immunoistochimica, spesso impiegata mediante l'uso di reagenti fluorescenti (immunofluorescenza) è essenziale per verificare la presenza di una frazione del complemento, il C4d, a livello glomerulare e peritubulare, dando una indicazione sulla attività della cTG (Regele 2002, Sis 2007, Gloor 2007). Vi sono invece poche evidenze sulla presenza di immunoglobuline A o G, o sulla deposizione di altre frazioni del complemento, come il C1q, che sembra essere invece più indicativo di un danno anticorpo mediato quanto riscontrato a livello sierico (Messina 2014).

#### **- Microscopia elettronica**

Studi recenti hanno dimostrato come la ME sia in grado già ad un anno del trapianto di evidenziare le alterazioni caratteristiche di cTG, anche quando le membrane basali glomerulari non mostrano l'aspetto a doppio contorno alla microscopia ottica.

Alla microscopia elettronica le alterazioni endoteliali precoci caratteristiche di cTG sono:

- ampliamento dello spazio subendoteliale
- rigonfiamento della matrice endoteliale
- perdita delle fenestrazioni della membrane basale
- duplicazione e o multislaminazione focale delle membrane basali glomerulari (GBM) e peritubulari.

Queste alterazioni precoci al livello della ME sono state riscontrate già nel 1994 in uno studio del gruppo di Torino (Mazzucco 1994), e confermate nei lavori di Wavamunno nel 2007 e di Haas nel 2011.

Allo stato attuale, molti Centri non eseguono la ME per la valutazione di tutte le biopsie renali, in parte per ragioni di costi, e in parte perché alcuni anatomopatologi ritengono sufficienti la MO e l'immunoistochimica per la diagnosi delle principali lesioni nel trapianto. Ciononostante, in certe situazioni, come le forme precoci di cTG, solo la ME è in grado di vedere e caratterizzare lesioni non altrimenti evidenziabili.

La necessità però di eseguire anche la valutazione alla ME per la diagnosi precoce di cTG, rende necessario stratificare i pazienti per il rischio di sviluppare la cTG, ed eseguire l'indagine in caso di riscontro di segni di attività immunologica (de HT 2012, Husain 2013).

### **Eziopatogenesi della cTG**

La cTG ha una patogenesi multifattoriale, non ancora del tutto nota (figura 13), in cui intervengono molteplici fattori, sia modificabili sia non modificabili, immunologici e non immunologici. Tra i fattori modificabili, un'immunosoppressione subottimale può esprimersi, a livello istologico, con la presenza di rigetti acuti subclinici, i quali influenzano negativamente la sopravvivenza del trapianto. Anche le comorbidità tipiche del paziente trapiantato, quali ipertensione, diabete, dislipidemia, infezioni delle vie urinarie, infezioni da virus del Polioma BK, l'HCV, il reflusso vescicoureterale sembrano accelerare la progressione della cTG, ma non è noto con sicurezza se possano influenzarne anche l'insorgenza (Layla Kamal, 2015). Per quanto concerne le condizioni associate allo sviluppo di cTG, si annoverano, tra le principali, il danno anticorpo-mediato, l'infezione da HCV e la microangiopatia trombotica. Secondo i recenti studi, è

ipotizzabile anche un coinvolgimento da parte degli autoanticorpi (Husain 2013).

## ***CAP 4: CELLULE STAMINALI PROVENIENTI DAL MIDOLLO OSSEO***

Il ruolo delle cellule staminali nella riparazione del danno tissutale è stato messo in evidenza da numerosi studi, rendendo sempre più concreta l'ipotesi di utilizzarle nel prossimo futuro quale terapia di differenti patologie.

Le cellule staminali nell'adulto sono indispensabili per garantire la rigenerazione di differenti organi e tessuti (come la cute, l'intestino, il sistema ematopoietico), che per mantenere la loro omeostasi si servono di un elevato turn-over cellulare. Altri organi come il rene, il polmone, il muscolo scheletrico e il fegato hanno un più lento turn-over cellulare; ciò nonostante, in seguito ad un danno, anche in questi organi si osservano processi di reclutamento, proliferazione e differenziazione delle cellule staminali.

Tali cellule hanno la capacità di auto rigenerarsi e differenziare in diverse varietà cellulari [24]. In particolare diversi studi hanno evidenziato la caratteristica plasticità di cui sono dotate le cellule staminali provenienti dal midollo osseo, capaci di differenziare in differenti tessuti [24, 25]. Sono state isolate cellule staminali residenti in molteplici organi quali il sistema nervoso centrale [26], la retina [27], il muscolo scheletrico [28], il fegato [29] e il rene [30]. Le cellule staminali residenti generano differenti tipi cellulari preferenzialmente del loro tessuto d'origine a testimoniare un loro ruolo pregnante nella crescita post natale dell'organo stesso, nel garantire il fisiologico turn over cellulare e la riparazione tissutale.

Nel midollo osseo si ritrovano due tipi di cellule staminali: le

cellule staminali mesenchimali (MSCs), che risiedono nel compartimento stromale del midollo osseo e le cellule staminali ematopoietiche (HSCs). Le MSCs sono cellule staminali adulte di origine mesodermica, che hanno la capacità di differenziare in cellule del tessuto connettivo, quali tessuto adiposo, osso, cartilagine e muscolo [25]. Le HSCs sono cellule indifferenziate, capaci di rigenerarsi e di differenziare in cellule altamente specializzate del compartimento ematico, quali eritrociti, leucociti e piastrine.

### **Le cellule progenitrici endoteliali**

Le EPC sono cellule endoteliali di derivazione midollari, dotate della capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature [30].

E' stato osservato che tali cellule sono presenti nel midollo come elementi immaturi, identificabili per la presenza di alcuni marcatori di superficie, come CD34, il CD133 ed il VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor) e che sono in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature, assumendo marcatori di superficie tipici di queste cellule e di secernere fattori di crescita, quando a contatto con i siti ischemici (Tabella 1)

<b>Surface Markers</b>	<b>Function</b>	<b>Cell Expression</b>
CD34	Glycoprotein important for cell-cell adhesion, maintenance of stem cells in bone marrow, mediates attachment of leukocytes to high endothelial venules	Hemangioblasts, Endothelial Progenitor Cells, Vascular Endothelial Cells
VEGFR-1 (Flt1)	Tyrosine kinase receptor for VEGF A and B, important for endothelial cell assembly into vessels	Myelo/Monocytic Progenitors, Vascular Endothelial Cells
VEGFR-2 (Flk1, KDR)	Tyrosine kinase receptor for VEGF A,C,D,&E, critical for hematopoietic and endothelial cell development, principal mediator of VEGF-A mitogenic and pro-migration ability	Hemangioblasts, Endothelial Progenitor Cells, , Myelo/Monocytic Cells,
CD133	Membrane glycoprotein, function unknown, serves as a marker for hematopoietic and endothelial progenitor cells	Hematopoietic Cells, Endothelial Progenitor Cells
CD45	Protein tyrosine phosphatase, important for lymphocyte activation via LCK and FYN	Cells of Hematopoietic System
VE-cadherin	Calcium dependent glycoprotein, intercellular junction protein necessary for proper vascular development	Mature Endothelial Cells

**Tabella 1.** Marcatori di superficie cellulare che definiscono funzionalmente le EPC

Le EPC sono coinvolte nei processi di angiogenesi, ovvero nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti e nella neovascologenesi [31] . In passato si riteneva che quest'ultimo fenomeno, che consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da un tessuto avascolare, fosse limitato alle fasi di sviluppo dell'apparato cardiovascolare durante la vita embrionale. Attualmente è stato verificato che questo processo può avvenire anche nell'organismo adulto, per opera delle EPC che, migrate dal midollo osseo ai tessuti periferici, partecipano alla formazione di nuovi vasi. Le EPC, infatti, svolgono due ruoli fondamentali nella fisiologia e fisiopatologia dell'apparato cardiovascolare: il mantenimento dell'omeostasi endoteliale e la neoangiogenesi. Le EPC sono dunque coinvolte nella neovascolarizzazione fisiologica, nella guarigione delle ferite, nella rigenerazione dei tessuti ischemici; tuttavia, il potenziale vasculogenico di tali cellule è utilizzato anche dai tumori, i quali sono capaci di provvedere al reclutamento di queste per favorire la propria crescita e metastasi.

#### **Meccanismi paracrini coinvolti nella comunicazione cellulare: ruolo delle microvescicole (MVs)**

Le cellule progenitrici endoteliali vengono prodotte nel midollo osseo e circolano nel sangue periferico localizzandosi nei siti di danno endoteliale, innescando processi di angiogenesi e riparazione tissutale. Le EPC sono state proposte come una nuova strategia terapeutica per la rigenerazione tissutale in diverse patologie associate a danno endoteliale.

Questa prospettiva potrebbe essere particolarmente importante nel contesto del danno endoteliale dovuto a rigetto anticorpo mediato nel trapianto di rene. L'uso di cellule staminali capaci

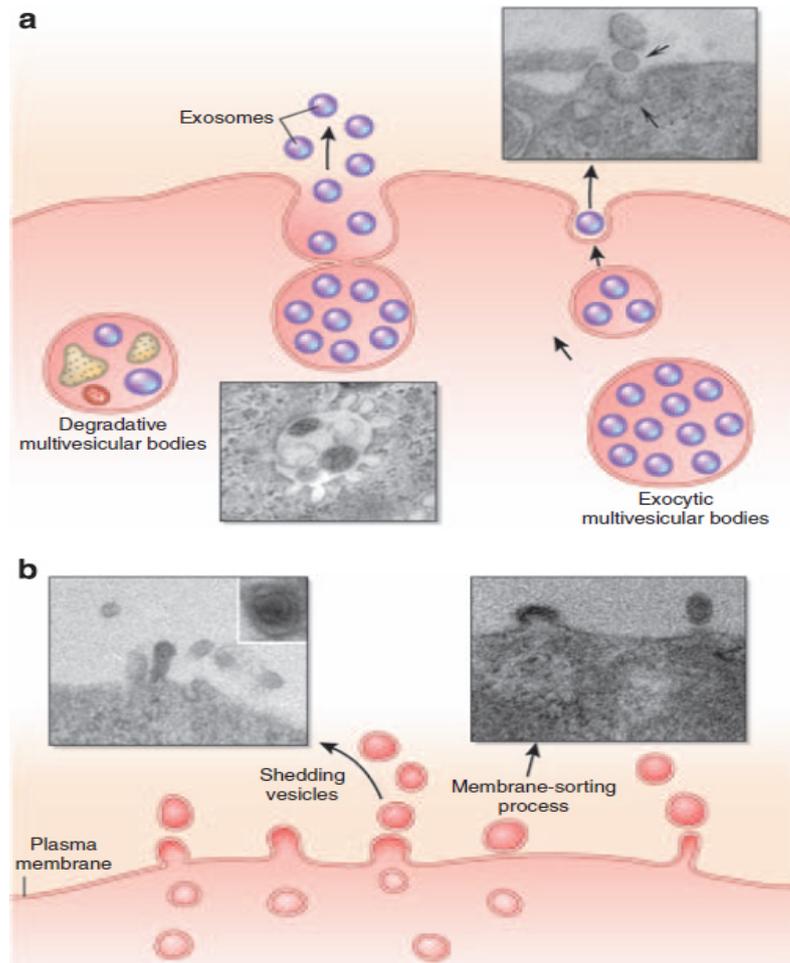
di integrarsi nell'endotelio danneggiato innescando angiogenesi può condurre a una limitazione della disfunzione del graft.

Numerosi studi hanno dimostrato che il potenziale rigenerativo delle EPC è correlato al rilascio di fattori paracrini. In tale contesto le microvescicole (MVs) sono frammenti di membrana rilasciati dal compartimento endosomale come esosomi o direttamente dalla superficie cellulare [33]. Per molto tempo erano stati considerati prodotti di scarto cellulari, formati in conseguenza di danno cellulare o come esito del fisiologico turnover di membrana [34]. Solo di recente è stato definito il ruolo delle microvescicole/esosomi rilasciati nel microambiente da parte di vari tipi cellulari.

Le MVs possono essere rilasciate attraverso due principali meccanismi: possono originare dal compartimento endosomale ed essere rilasciate dalla superficie cellulare dopo fusione con la membrana plasmatica come esosomi [34]; oppure possono “germogliare” direttamente dalla superficie della membrana cellulare (attraverso il meccanismo di shedding) [35]. La popolazione di vescicole che si ritrova nelle colture *in vitro* ed *in vivo* nei fluidi biologici è un mix di esosomi e di *shedding vesicles*, che nell'insieme prendono il nome di microvescicole (figura 4).

Dopo il loro rilascio le MVs possono rimanere nello spazio extracellulare in prossimità del loro sito di origine oppure possono entrare nei fluidi biologici, raggiungendo siti anche lontani (sono state trovate in diversi fluidi come il plasma, le urine, il latte, il liquido cerebro-spinale). Le MVs sono una popolazione cellulare variegata, che si diversifica per il sito d'origine, il numero, la dimensione e la composizione antigenica

[36], che vengono rilasciate da diversi tipi cellulari in condizioni sia fisiologiche che patologiche.



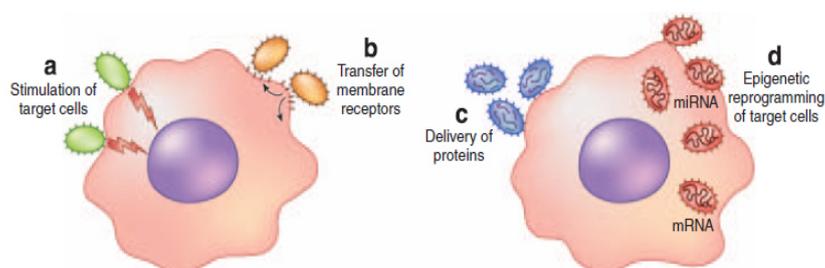
**Figura 9:** Rappresentazione schematica della formazione degli esosomi (a) e delle shedding vesicles (b) (Camussi G et al, *Kidney International* 2010; 78: 838-848)

### L'attività biologica delle MVs

Attualmente le MVs sono considerate parte integrante del microambiente intercellulare e giocano un ruolo chiave nella comunicazione cellula-cellula.

Questo concetto è basato sull'osservazione che le MVs rilasciate da determinati tipi cellulari interagiscono con altre cellule

mediante specifici recettori, inducendo l'attivazione cellulare o direttamente o attraverso il trasferimento di recettori di superficie [37]. Questo indica come le Mvs interagiscano esclusivamente con la cellula loro target e non con qualunque cellula del microambiente [38]. L'interazione avviene attraverso un legame cellula-cellula, recettore-mediato, grazie a cui avviene la comunicazione intercellulare [35]. Una volta internalizzate le Mvs possono fondere la loro membrana con quella endosomiale rilasciando il loro contenuto attraverso trasferimento orizzontale nel citosol delle cellule target. In alternativa è possibile che le MVs rimangano segregate negli endosomi e siano trasferite ai lisosomi o espulse dalle cellule dopo il processo di fusione con la membrana, dando vita al cosiddetto processo di transitosi [35]. Il comportamento delle cellule target può essere variabilmente influenzato dalle MVs e le MVs possono influenzare il comportamento delle cellule target in vario modo (Figura 5)



**Figura 10.:** Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella comunicazione cellula-cellula mediate dalle MV; (a) stimolazione diretta; (b) trasferimento di recettori; (c) trasferimento di proteine; (d) trasferimento di mRNA/miRNA (*Camussi G et al, Kidney International 2010; 78: 838-848*)

Le MVs, sotto forma di complessi-segnale, possono stimolare direttamente l'attivazione delle cellule target (ad es. le MVs implicate nella cascata della coagulazione che derivano dalle

piastrine) [33]. Possono anche agire trasferendo tra le varie cellule dei recettori (ad es. il trasferimento di recettori antigenici dai linfociti B o il trasferimento del CD41 dalle piastrine alle cellule endoteliali). Inoltre sono in grado di trasferire da una cellula all'altra del materiale proteico (ad es. i monociti inducono la morte delle cellule del muscolo liscio attraverso il rilascio di MVs contenenti la caspasi-1). Le MVs possono mediare trasferimento orizzontale di materiale genetico. E' stato osservato che le MVs che originano da cellule tumorali possono trasferire non solo antigeni di superficie, ma anche mRNA delle cellule tumorali stesse ai monociti [39]. Inoltre le MVs derivanti dalle ECS esprimono l'mRNA di numerosi fattori di trascrizione che possono essere trasferiti alle cellule target e tradotti nelle corrispondenti proteine. Il trattamento delle MVs con l'RNase inibisce la loro azione, a testimonianza del fatto che il ruolo dell'mRNA è centrale nella mediazione degli effetti delle MVs.

Il nostro gruppo ha inoltre dimostrato che le MVs che originano dai progenitori endoteliali umani (EPCs) possono agire proprio come veicolo nel trasporto di mRNA tra le cellule [37]. Le MVs delle EPCs sono internalizzate nelle cellule endoteliali attraverso l'interazione con le integrine  $\alpha 4$  e  $\beta 1$  espresse sulla loro superficie e attivano un programma angiogenetico. Attraverso l'analisi RT-PCR è stato possibile rilevare che le MVs veicolano uno specifico subset di mRNA cellulare, che include gli mRNA implicati nel pathway dell'angiogenesi come le vie di segnalazione di PI3K/AKT ed eNOS. Dopo l'incorporazione delle MVs a livello intracellulare si ha un'up-regulation delle proteine fosfatidilinositolo 3-kinasi e dell'ossido nitrico sintasi. Yuan et al. hanno recentemente dimostrato che le MVs insieme all'mRNA trasferiscono anche dei microRNA [38]. Il nostro gruppo ha dimostrato che anche le MVs delle EPCs contengono

microRNA, in particolare contengono miR-126, miR-296, che sono due microRNA con azione pro-angiogenetica coinvolte nei *pathways* di VEGF, EGF ed FGF. Dato che i microRNA sono regolatori fisiologici della traslazione proteica, il fatto che i microRNA possano essere trasferiti tra cellula e cellula attraverso le MVs indica che le cellule staminali, ma anche cellule mature possano alterare l'espressione genica di altre cellule attraverso questo meccanismo.

### **Ruolo delle microvescicole**

Le MVs svolgono un importante ruolo nell'arginare il processo infiammatorio, fungendo da “carrier” sia per fattori anti-infiammatori che pro-infiammatori. Le Mvs derivanti da piastrine e macrofagi sono state riscontrate nel core lipidico di placche aterosclerotiche come potenziale trigger del segnale pro-infiammatorio, angiogenetico e trombotico. Da queste osservazioni deriva la possibilità di utilizzare le Mvs come target terapeutico nell'aterosclerosi.

Inoltre, in modelli di patologia cardiovascolare si riscontrano livelli aumentati di Mvs di origine endoteliale. Le cellule endoteliali danneggiate parrebbero rilasciare le Mvs che sono pertanto considerabili un marcatore di disfunzione endoteliale. Sono inoltre implicate nella modulazione dello stato infiammatorio in quanto, nelle fasi iniziali dell'infiammazione, le MV derivanti dai neutrofili stimolano la produzione di citochine antiinfiammatorie; nelle fasi più tardive, invece, le Mvs derivanti dai fibroblasti inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie.

Sebbene in soggetti sani le Mvs circolanti derivino principalmente dalle piastrine, in condizioni patologiche possono originare da altre cellule quali quelle endoteliali, le cellule infiammatorie e gli eritrociti. Livelli incrementati di Mvs si possono riscontrare in varie patologie quali la preeclampsia, il diabete, la sindrome coronarica acuta, l'ipertensione, la sclerosi multipla, le vasculiti e anche in pazienti affetti da insufficienza renale cronica.

### **Vantaggi di utilizzo delle microvescicole**

Sin dall'introduzione della terapia cellulare sono molteplici i dubbi che la comunità scientifica ha avanzato sulla sicurezza di utilizzo delle cellule staminali. E' stata infatti riportata la possibilità di mal differenziamento delle cellule e trasformazione in cellule tumorali. Questi eventi sono imprevedibili e rappresentano uno dei limiti di utilizzo e della diffusione della terapia cellulare. Le Mvs, classificate dall'EMEA come prodotti terapeutici avanzati, agiscono con una sorta di meccanismo di "switch on-off" più simile alla somministrazione di un farmaco che ad una terapia cellulare.

## ***SCOPO DELLO STUDIO***

Il lavoro è stato articolato in tre parti. In una **PRIMA PARTE** prettamente clinica, sono state analizzate le caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione di pazienti trapiantati di rene con diagnosi istologica di cTg, sottoposti a biopsia renale presso il Centro Trapianti Renali “A. Vercellone”, A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino

E' stata quindi valutata a livello bioptico l'espressione degli inibitori del complemento e in particolare di CD55, CD59 e del MAC nei pazienti con diagnosi istologica di rigetto acuto anticorpo-mediato e DSA circolanti.

Successivamente, in una **SECONDA PARTE** sono state isolate e caratterizzate le MV derivanti dalle EPC e valutare l'effetto protettivo delle MV nel prevenire il danno anticorpo mediato a livello endoteliale. Le microvescicole sono state caratterizzate per pattern di espressione di proteine e di RNA, inclusi i mRNA e i microRNA.

In particolare è stata valutata la presenza e l'effetto biologico di molecole inibitorie del complemento quali CD55, CD59 e fattore H a livello di cellule endoteliali glomerulari (hGEC), stimulate con sieri iperimmuni contenenti anticorpi anti-HLA, in un modello in vitro di danno endoteliale da rigetto anticorpo-mediato. Inoltre è stata studiata la capacità della MV derivanti dalle EPC di trasferire microRNA specifici, microRNA pro-angiogenetici (in particolare miRNA126 e miR-296) in grado di attivare l'angiogenesi.

Infine, in una **TERZA PARTE**, è stato valutata la presenza e ruolo degli AT1R-Ab nella cTG

## ***MATERIALI E METODI***

### **Descrizione della popolazione selezionata**

Il presente studio è stato svolto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

E' stato condotto uno studio retrospettivo, monocentrico, valutando tutti i pazienti che sono stati sottoposti a biopsia renale su rene trapiantato tra Gennaio 2007 e Dicembre 2014, presso il Centro Trapianti Renali "A. Vercellone", A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino e seguiti presso l'Ambulatorio post-trapianto del Centro. La scelta del periodo di selezione è stata dettata dalla rapidità di evoluzione del concetto di cTG e dalla necessità di avere definizioni precise e protocolli immunosoppressivi standardizzati.

Come fine follow up è stato considerato 31 gennaio 2016 o la morte del paziente od il fallimento del trapianto con conseguente rientro in dialisi nel caso questi siano avvenuti prima di tale data.

Tra questi sono stati poi selezionati i pazienti con diagnosi biopsica di cTG. Tutte le biopsie sono state eseguite "per causa"; le due principali indicazioni sono state l'incremento della creatinina > 20% rispetto al dato basale e/o una proteinuria > 1 g/die. Sono state escluse le biopsie di protocollo.

La **cTG è stata definita istologicamente**: membrana basale a doppio contorno, rigonfiamento delle cellule endoteliali dei capillari e/o ipercellularità glomerulare (focale, segmentaria e diffusa). In tutti i casi è stata effettuata la ricerca del C4d su tessuto con tecnica di immunisto chimica. E' stata definita la negatività o la positività con il relativo grado in base alla presenza di C4d nei capillari peritubulari sia corticali che midollari e/ delle anse glomerulari.

**Per la prima parte dello studio**, con analisi a livello istologico dell'espressione degli inibitori del complemento, sono stati selezionati pazienti trapiantati di rene con diagnosi biotica di “rigetto acuto anticorpo-mediato” con positività per C4d e presenza di DSA circolanti.

**Per la seconda parte dello studio** sono stati selezionati invece, pazienti iperimmuni i cui sieri sono stati prelevati prima che i pazienti venissero sottoposti a trattamento di desensibilizzazione in previsione di futuro trapianto. Per “paziente iperimmune” si intende che gli anticorpi presenti nel siero di quel paziente riconoscono antigeni HLA presenti in almeno l'80% della popolazione. L'iperimmunizzazione costituisce un'importante barriera per il raggiungimento del trapianto ed è un motivo delle lunghe liste di attesa di questa classe di pazienti.

**Per la terza parte dello studio** sono stati selezionati i pazienti con diagnosi biotica di cTG. Di questi pazienti è stato retrospettivamente analizzati sia i sieri relativi al pre-trapianto che quelli al momento della biopsia renale stessa.

I dati clinici e demografici raccolti sono stati: età, sesso, numero di trapianti precedenti, immunizzazione pre-trapianto anti-HLA (% storico e picco di classe I e classe II, cPRA, determinato in Luminex), tempo di ischemia fredda, ritardata ripresa funzionale (DGF: definita come necessità di almeno 1 seduta dialitica nella prima settimana post trapianto), protocollo immunodepressivo di induzione e mantenimento, storia di ipertensione, cardiopatia, vasculopatia, HCV positività e rigetti acuti (cellulari e anticorpo-mediati).

I dati relativi ai pazienti presi in esame sono stati raccolti utilizzando come fonti principali le cartelle dell'Ambulatorio Post-trapianto renale presso cui tutti i pazienti trapiantati sono seguiti e le lettere di dimissioni del Centro Trapianti Renali "A. Vercellone", A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino (sia al momento del trapianto sia dei ricoveri intercorrenti). Per l'archiviazione e la catalogazione dei dati ci si è serviti di un foglio di lavoro Microsoft Excel<sup>™</sup>

## **PRIMA E SECONDA PARTE DELLO STUDIO**

### **Prelievo dei sieri dei pazienti**

Per la prima e la seconda parte dello studio sono stati utilizzati i sieri di pazienti trapiantati di rene affetti da rigetto cronico anticorpo mediato e con presenza di anticorpi anti HLA donatore specifici (DSA). I test di valutazione della presenza di anticorpi anti HLA di classe I e II sono stati fatti utilizzando il kit One Lambda (Canoga Park, CA) LabScreen LSM12 (LabScreen Mixed) e LABScreen single antigen beads (HLA Class I, LS1A04 and Lot 007 and HLA Class II, LS2A01 and Lot 009) seguendo le istruzioni della ditta. La fluorescenza è stata misurata in Luminex (Luminex, Austin, TX, USA) e i risultati sono stati espressi in "intensità media di fluorescenza" (MFI). I sieri sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

### **Valutazione espressione CD55, CD59 e MAC a livello biotico**

Sono state utilizzate biopsie eseguite in pazienti trapiantati di rene con diagnosi di "rigetto cronico anticorpo mediato" e presenza di DSA a livello sierico. La diagnosi istologica di

AMCR è stata eseguita dal Servizio di Anatomia Patologica in base all'osservazione in microscopia ottica con talora conferma in microscopia elettronica e immunofluorescenza. Tutte le biopsie rispettavano i criteri Banff diagnostici per AMCR e pertanto caratterizzati, oltre che dai segni istologici tipici, dalla positività per il C4d a livello dei capillari peritubulari e/o glomerulari.

La positività per CD55, CD59 e MAC è stata valutata in immunofluorescenza su 11 pazienti, utilizzando anticorpi mouse anti-human CD55, CD59 e MAC (AbD Serotec).

Le biopsie renali sono state congelate in azoto liquido e sezionate con criostato in sezioni dello spessore di 2 mm e quindi fissate con formaldeide al 3,5% per 15 minuti e successivamente lavate con PBS. Le sezioni sono state incubate per 1 a temperatura ambiente con anticorpo murini anti CD 55 umano (AbD Serotec, alla diluizione dei 1:5). Successivamente le sezioni sono state incubate con un anticorpo secondario anti-mouse IgG (Alexa Fluor 488) a 30 minuti a temperatura ambiente. Come controllo negativo le sezioni sono state incubate esclusivamente con l'anticorpo secondario. Come colorazione nucleare è stato utilizzato Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Lo stesso procedimento è stato effettuato incubando le sezioni con anticorpo murino anti CD59 umano (AbD Serotec, alla diluizione dei 1:100) e anticorpo murino anti MAC umano (AbD Serotec, alla diluizione dei 1:50) Le sezioni sono state visualizzate con microscopio confocale modello Zeiss LSM5 Pa (Carl Zeiss International, Germany). L'espressione di CD55, CD59 e MAC è stata analizzata semiquantitativamente misurando fluorescenza intensità da analisi di immagine digitale dopo la sottrazione della

fluorescenza di fondo del tessuto, utilizzando il programma di analisi di immagine LSM (Carl Zeiss International).

### **Isolamento e caratterizzazione delle EPC**

Le EPC sono state isolate a partire dalle cellule mononucleate del sangue periferico di donatori sani mediante centrifugazione su gradiente di densità. (*Histopaque 1077*; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) [40]. Successivamente,  $8 \times 10^6$  cellule mononucleate per ml sono state piastrate in fiasche di coltura, rivestite con fibronectina, coltivate in *medium* basale (EBM-2; Clonetics Biowhittaker, Walkersville, MD) arricchito con 5% di siero fetale bovino, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2, epidermic growth factor, insulin-like growth factor-1, e acido ascorbico. Dopo tre giorni di coltura, le cellule non adese sono state rimosse effettuando un lavaggio con PBS, mentre le cellule rimanenti sono state coltivate nello stesso *medium* fino alla comparsa delle prime colonie.

Le EPC sono state caratterizzate per l'espressione di antigeni di superficie: non esprimono marcatori quali CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD20, CD62E, VEGFR-1, CD14, e, mentre sono risultate positive per CD34, CD133, Tie-2, VEGFR-3, and VEGFR

Il fenotipo endoteliale è stato confermato in Western Blot e in RT-PCR attraverso l'espressione di marcatori endoteliali quali Tie-2, VEGFR-2, e VEGFR-3 ma non VEGFR-1.[37]

### **Isolamento e caratterizzazione di MV originate dalle EPC**

Le MV sono state ottenute dai surnatanti delle EPC coltivate in *medium* EMB-2. I surnatanti di tali colture, privi di

contaminazioni cellulari macroscopiche, sono stati sottoposti inizialmente a tre successive centrifugazioni a 3000g per 20 minuti, per rimuovere i detriti cellulari, e successivamente ad una ultracentrifugazione a 100000g (Ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L-90K) per un'ora a 4 gradi. In seguito, il *pellet* contenente le MV è stato sottoposto a lavaggi con *medium* 199 senza siero contenente 25mM HEPES e ultracentrifugato nuovamente nelle stesse condizioni. Infine, il pellet ottenuto è stato risospeso in medium 199 senza siero contenente 25mM HEPES e quantificato (in termini di contenuto proteico) mediante il metodo Bradford (Biorad) [37]

In esperimenti selezionati le MVs sono state trattate con 1U/ml di RNAsi (Ambion) per un'ora a 37°C. Successivamente la reazione è stata bloccata mediante 10 U/ml di inibitori della RNAsi (Promega) e le MV sono state sottoposte nuovamente ad ultracentrifugazione. Il contenuto di RNA delle MV trattate con RNAsi è stato analizzato mediante Bioanalyzer usando il Kit RNA 6000 Nano LabChip.

#### *Analisi citofluorimetrica per la valutazione dimensionale delle MV*

Per la valutazione dimensionale delle MV è stata effettuata un'analisi FACS (Becton Dickinson) utilizzando microbiglie di diverse dimensioni (1, 2, 4 e 6 µm; Molecular Probes). In tale analisi, le MV sono state coincubate con le biglie dimensionali e analizzate utilizzando una scala logaritmica per i parametri forward scatter e side scatter.

#### *Trattamento delle MV per la microscopia elettronica*

Le MV derivanti dalle EPC sono state fissate con una soluzione contenente 2,5% di paraformaldeide e 2% di saccarosio. I campioni sono stati quindi immersi in azoto liquido (hatching), post-fissati in glutaraldeide 2,5%, disidratati in alcool e rivestiti con uno strato sottile di carbonio o oro. Le MV sono state analizzate al microscopio elettronico a scansione (LEO 1430 VP).

### **Transfezione delle EPC con antagomiR diretti contro il miR-126 e il miR-296**

100 pmol di antagomiR diretti contro il miR-126 e il miR-296 (Ambion) sono stati transfettati nelle EPC, coltivate su piastre da sei pozzetti, utilizzando 4µl di lipofectamina 2000 (Invitrogen), con le modalità indicate dalla ditta produttrice.

Come controllo positivo, le EPC sono state transfettate con un anti-miR coniugato alla 5-carbossifluoresceina (FAM), privo di attività biologica.

### **Tranfezione delle EPC con siRNA diretti contro il CD55, CD59 e Fattore H**

80 pmol di siRNA *duplex* diretti contro il CD55, CD59 e fattore H (Santa Cruz Biotech.) sono stati transfettati nelle EPC, coltivate su piastre da sei pozzetti, utilizzando 8µl di *siRNA Transfection Reagent* con le modalità indicate dalla ditta produttrice. Come controllo positivo, le EPC sono state transfettate con un *control siRNA* coniugato alla fluoresceina, privo di attività biologica.

### **Estrazione RNA e analisi RNA mediante Bioanalyzer**

Per l'estrazione di RNA dalle EPC wild-type, dalle EPC trasfettate con siRNA diretti contro il CD55, CD59 e fattore H e con antagomiR specifici per il miR126 e miR296 e dalle MV derivate da questi tipi cellulari, è stato usato il kit MirVana (Ambion). Le MV e le EPC sono state lisate e l'RNA è stato estratto attraverso l'uso di fenol-cloroformio ed etanolo ed eluito da appositi filtri con una soluzione priva di RNAsi. L'RNA ottenuto è stato sottoposto ad analisi mediante Bioanalyzer per valutare la presenza di diverse popolazioni di RNA nelle MV usando il Kit RNA 6000 Nano LabChip. Brevemente, 5 µg di RNA sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica in un microcapillare contenente una soluzione gradiente. I dati ottenuti dalla corsa elettroforetica sono stati analizzati con l'uso di software informatici ed elaborati in grafici per definire la quantità e la lunghezza nucleotidica dei diversi tipi di RNA.

### **Analisi Real-Time qPCR**

La real-time PCR quantitativa è stata effettuata sull'RNA estratto dalle EPC *wild-type*, EPC trasfettate con siRNA diretti contro il CD55, CD59 e Fattore H, EPC trasfettate con antagomiR diretti contro il miR126/296 e dalle MV rilasciate da questi tipi cellulari per confermare l'assenza degli inibitori del complemento e del miR126/296 nelle EPC trattate e nelle MV da esse derivate.

Il primo filamento di cDNA è stato ottenuto dall'RNA totale usando il *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per ogni cDNA sono stati usati dai 200 ai 400 ng di mRNA, 2 µl di *buffer* RT, 0,8 µl

di dNTP, 2  $\mu$ l di random *primer* RT, 1  $\mu$ l di trascrittasi inversa MultiScribe e 4,2  $\mu$ l di acqua priva di nucleasi. Dopo la trascrittasi inversa, il cDNA è stato conservato a -20°C. Sono stati poi presi 20  $\mu$ l della mix per la RT-PCR, contenente 1X SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM di ogni primer, 0,1  $\mu$ l, e 2  $\mu$ l del cDNA delle EPC e delle MV e inseriti nella piastra a 48 pozzetti StepOne Real Time System (Applied Biosystems). Come controllo negativo è stata utilizzata una mix senza cDNA ed è stata caricata in parallelo ad ogni campione.

### **Analisi FACS per valutare l'espressione degli inibitori del complemento a livello proteico nelle EPC**

Per valutare l'espressione degli inibitori del complemento a livello proteico sia nelle EPC wild-type, sia nelle EPC transfettate con i siRNA diretti contro il CD55, CD59, Fattore H, e nelle MV da esse derivate, è stata effettuata un'analisi FACS utilizzando anticorpi coniugati con fluorocromi FITC e PE diretti contro CD55, CD59 (BD Pharmingen), e Fattore H (Abcam). Come controllo sono state utilizzate IgG murine non immuni FITC o PE.

In particolare, le EPC e le MV sono state incubate con l'anticorpo specifico o con l'isotipo di controllo per un'ora a 4°C in PBS 0,25% BSA (Acros Organics), sodiaazide 0,02% (Sigma-Aldrich) e successivamente sottoposte ad analisi FACS (Becton Dickinson Biosciences)

### **Isolamento e caratterizzazione delle cellule glomerulari endoteliali (GEC)**

Per gli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate linee cellulari primarie microvascolari di origine endoteliale ottenute da glomeruli renali.

Brevemente, i glomeruli umani sono stati purificati dalla porzione normale di reni sottoposti a nefrectomia a causa di carcinoma polare, effettuando passaggi seriali attraverso filtri di differenti dimensioni; successivamente sono stati digeriti con tripsina (0,1%, per 30 minuti a 37°C), piastrati in fiasche rivestite con 1% di gelatina e coltivati nel *medium* EBM completo (Clonetics). Dopo una settimana le cellule sono state staccate e selezionate sulla base dell'espressione del marker endoteliale CD31 mediante *sorting* immunomagnetico (Miltenyi Biotech); successivamente caratterizzate in base alla morfologia e all'espressione di *marker* endoteliali. [41]

### **Internalizzazione delle MV**

Per valutare l'internalizzazione delle MV isolate dalle EPC nelle GEC, le MV sono state colorate con un cromoforo rosso alifatico PKH26. Le GEC sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e incubate con 50  $\mu$ g/ml di MV marcate a 37°C

L'internalizzazione delle MV è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza (Zeiss LSM 5 PASCAL,) e analisi FACS in presenza o assenza di 1  $\mu$ g/ml di anticorpi bloccanti diretti contro l'integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3 (BioLegend), integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Chemicon), CD29 o L (Chemicon, Dickinson).

### **Analisi FACS per valutare l'espressione di molecole pro-infiammatorie a livello proteico nelle GEC**

Per valutare l'effetto dei sieri iperimmuni sull'espressione delle molecole pro-infiammatorie nelle GEC, queste ultime sono state incubate per 12 ore con siero di controllo AB (Sigma) e con sieri iperimmuni in presenza o assenza di 50  $\mu$ g/mL di MV isolate dalle EPC pre-trattate o meno con 1U/ml di RNAsi o di MV isolate dalle EPC transfettate con siRNA diretti contro il CD55, CD59, Fattore H o con un siRNA di controllo. Dopo l'incubazione le cellule sono state analizzate in citofluorimetria per quantificare l'espressione del MAC, E-selectina, VCAM-1 e CD40. Sono stati quindi utilizzati anticorpi coniugati con fluorocromi FITC e PE diretti contro CD40 (BD Pharmigen), VCAM-1 (RD Systems), e-selectina (BD Pharmigen) e MAC (Dako). Come controllo sono state utilizzate IgG murine non immuni FITC o PE.

### **Adesione dei PBMC e delle Natural Killer (NK) sulle GEC e sulle PAEC**

I PBMC sono stati isolati a partire dal sangue periferico di donatori volontari sani mediante centrifugazione su gradiente di densità, (Histopaque 1077; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Mentre le NK sono state purificate dai PBMC e selezionate per l'espressione del CD56 mediante sorting immunomagnetico (Miltenyi Biotech) Successivamente i PBMC e le NK sono stati marcati con 10  $\mu$ l di colorante Vybrant cell (In

Per testare l'adesione dei PBMC e delle NK sulle GEC,  $50 \times 10^6$ /ml PBMC o  $5 \times 10^6$ /ml NK sono stati incubati su

monolayer di cellule confluenti stimulate con un siero di controllo AB (Sigma) e con sieri iperimmuni in presenza o assenza di 50  $\mu\text{g/ml}$  di MV pre-trattate o meno con 1U/ml di RNasi o di MV isolate dalle EPC transfettate con siRNA diretti contro il CD55 CD59, Fattore H o con un siRNA di controllo.

### **Analisi della proliferazione delle GEC**

L'analisi della proliferazione è stata eseguita utilizzando il kit 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) Labeling and Detection Kit II (Roche).

Le cellule sono state piastrate in 96-*well* ad una concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule per pozzetto, incubate per 12 ore in medium senza FBS e successivamente stimulate con sieri iperimmuni in presenza o assenza di MV pre-trattate o meno con 1U/ml di RNasi per 6 ore. Successivamente le cellule sono state sottoposte a test ELISA per la rilevazione della presenza di BrdU incorporata nel DNA, secondo le indicazioni fornite dal protocollo. I valori di assorbimento sono stati valutati mediante analisi spettrofotometrica.

### **Angiogenesi**

La formazione di strutture simil-capillari è stata valutata in vitro piastrando  $5 \times 10^4$  GEC/pozzetto, in pozzetti rivestiti con Matrigel (Becton Dickinson), una membrana basale solubilizzata derivata da sarcoma murino priva di fattori di crescita, con *medium* RPMI senza siero. Le GEC sono state incubate per 6 ore a  $37^\circ\text{C}$  con siero AB (Sigma) come controllo o sieri iperimmuni, in presenza o assenza di 50  $\mu\text{g/ml}$  di MV o

di MV pretrattate o meno con 1U/ml di RNAsi o con MV derivate da EPC trasfettate con antagomiR diretti contro il miR-126 e il miR 296.

Le immagini sono state acquisite mediante microscopio invertito (Nikon), utilizzando l'ingrandimento 40X. I risultati sono stati espressi in termini di numero medio di strutture simil-capillari per campo di osservazione.

### **Apoptosi**

Per valutare il tasso di apoptosi, abbiamo utilizzato il sistema TUNEL, *ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Chemicon International). Le GEC sono state starvate per 12 ore in assenza di siero per indurre l'apoptosi e successivamente, le GEC sono state trattate con siero AB (Sigma) come controllo o con sieri iperimmuni, in presenza o assenza di 50 ug/ml di MV pretrattate o meno con 1U/ml di RNAsi o con MV derivate da EPC trasfettate con antagomiR diretti contro il miR-126 e il miR 296 per 12 ore. I campioni sono stati quindi analizzati al microscopio a fluorescenza e le cellule apoptotiche sono state contate in dieci diversi campi presi a campione (ingrandimento 100x).

## TERZA PARTE DELLO STUDIO

### **Valutazione della presenza di AT1R-Ab e DSA**

Sono stati testati retrospettivamente tutti i sieri disponibili, prelevati sia pre-trapianto (PT-AT1R-Ab) che al momento della biopsia renale (BT-AT1R-Ab).

Su tali sieri è stata valutata la presenza di AT1R-Ab IgG usando il kit ELISA in commercio (One Lambda Inc, Canoga Aprk, CA). Il test è stato eseguito in accordo alle istruzioni della ditta. Il siero dei pazienti è stato diluito 1:200 incubandolo in una piastra di microtitolazione pretrattata con AT1R. La presenza di AT1R-Ab è stata evidenziata dal legame con un secondo anticorpo marcato con perossidasi.

La risultante densità ottica è stata determinata tramite l'utilizzo di spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 655 nm (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA). Ogni test è stato validato da un controllo negativo e positivo e ogni campione è stato eseguito in doppio. Il risultato del test è definito positivo se  $> 17$  UI/ml, a rischio se 10-17 UI/ml, negativo se  $< 10$  UI/ml, in accordo con le istruzioni del test stesso.

Tutti i sieri ottenuti al momento della biopsia renale sono stati screenati per la presenza di anticorpi DSA (Test in citofluorimetria , FLOW-PRA Screening-One Lambda). Il risultato è stato espresso in intensità di fluorescenza media (MFI) con cut off di positività  $> 1000$ .

I sieri dei pazienti, acquisiti ai controlli di routine pre-biopsia, sono stati quindi conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

### **Analisi statistica**

L'analisi è stata effettuata con Spss (IBM SPSS Statisticm vers 22.0.0). La distribuzione gaussiana delle variabili continue è stata valutata con test di kolmogorov-Smirnov. Le variabili continue sono state descritte con la mediana (min-max) e la differenza tra i gruppi verificata con test non parametrico (Mann-Withney). Le distribuzioni normali sono state descritte da media e deviazione standard e la differenza tra i gruppi è stata valutata con t-test. Sa sopravvivenza è stata analizzata con curve di Kaplan-Meier e test log-rank. Il livello di significatività è stato fissato a 0.05.

## ***RISULTATI***

## PRIMA PARTE DELLO STUDIO

### DESCRIZIONE DELLA POPOLAZIONE

La popolazione in studio è descritta nella tabella 2

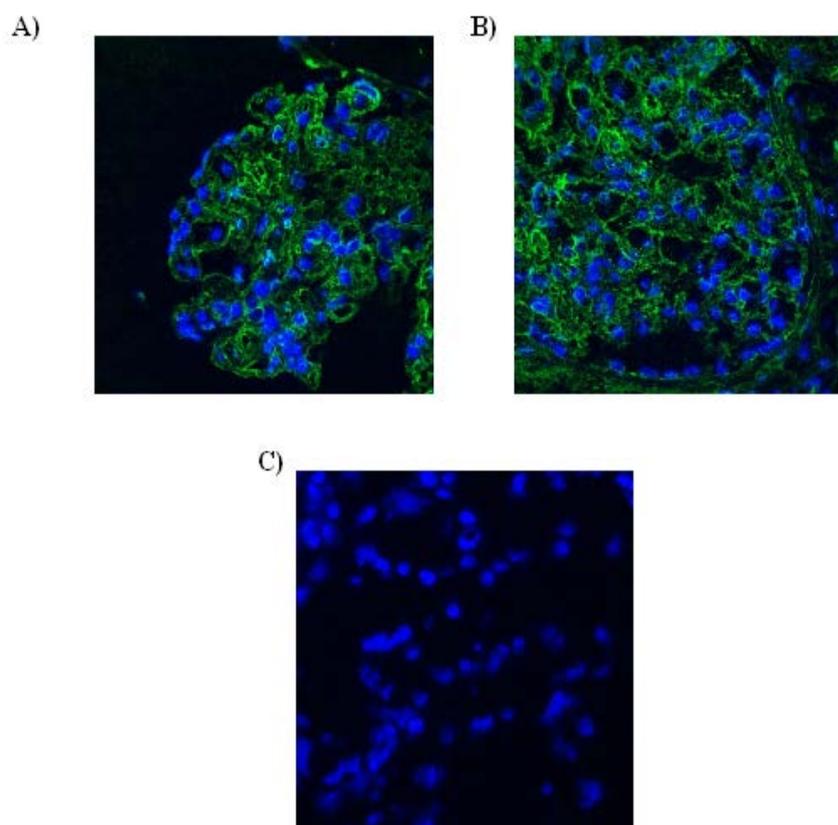
	<b>PAZIENTI</b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>PRE-TRAPIANTO</b>						
<i>Età</i>	10	62	38	11	47	51
<i>PRA % ultimo siero</i>	0	0	0	0	0	0
<i>PRA % max</i>	0	6,7	75	0	0	16
<i>Sesso (M/F)</i>	M	M	M	F	F	M
<i>Malattia di base</i>						
<i>IRC di ndd</i>	0	0	1	1	0	0
<i>Immunologica</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Non immunologica</i>	1	1	0	0	1	1
<b>TRAPIANTO data</b>	09/11/00	09/09/09	13/03/06	02/03/83	-/-/2001	12/11/03
<i>N° trapianti</i>	1	1	2	2	3	1
<i>Terapia induzione</i>	Sim+Tac +MMF+ St	Sim+ Eve+ MPA+St	Sim+Ta c+St	Sim+Cy A+Aza+ St	Sim+Ta c+MMF +St	Sim+Cy A+MMF +St
<b>DIAGNOSI AMCR</b>						
<i>Terapia ID</i>		<i>Tac+St</i>	<i>Eve+M MF+St</i>	<i>Tac+M MF+St</i>	<i>No (espianto)</i>	<i>CyA+Ev e+St</i>
<i>Crs (mg/dL)</i>		1,8	5	2,2	5	2,7
<i>PTO (g/die)</i>		0,3	np	4	np	3,4
<b>BIOPSIA data</b>	07/06/11	09/05/11	15/04/11	16/03/11	12/01/11	23/12/09
<i>Diagnosi associate</i>	<i>RVA</i>	<i>GPTA</i>	<i>GPTA</i>	<i>Tossicità CNI</i>	<i>Danno vascolare</i>	<i>No</i>
<i>CD4 positività</i>	<i>Si</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Np</i>	<i>Si</i>
<b>DSA</b>						
<i>Tipo</i>	<i>A24, B49</i>	<i>DQ2</i>	<i>A1</i>	<i>DQ6</i>	<i>A3,A31, DQ3,DR 52,DR5 3</i>	<i>A1</i>
<i>MFI</i>	7600	1200	3400	27200	np	np

	<b>PAZIENTI</b>				
	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>PRE-TRAPIANTO</b>					
<i>Età</i>	59	40	3	41	49
<i>PRA % ultimo siero</i>	0	0	0	0	0
<i>PRA % max</i>	0	0	0	0	0
<i>Sesso (M/F)</i>	F	F	M	M	M
- IRC di ndd	0	0	1	0	1
- Immunologica	1	1	0	0	0
- Non immunologica	0	0	0	1	0
<b>TRAPIANTO data</b>	06/03/07	12/03/07	04/11/04	05/09/88	24/04/07
<i>N° trapianti</i>	1	1	1	1	1
<i>Terapia induzione</i>	Sim+Tac+MPA+St	Sim+Tac+MPA+St	Sim+Tac+MPA+St	Sim+CyA+Aza+St	Sim+MPA+St
<b>DIAGNOSI AMCR</b>					
<i>Terapia ID</i>	Eve+MPA+ST	Tac+St	np	No (espianto)	Tac+MPA
<i>Crs (mg/dL)</i>	3,5	1,5	np		4
<i>PTO (g/die)</i>	5	0,5	np		1,6
<b>BIOPSIA data</b>	18/02/10	17/05/10	21/01/10	21/01/10	27/06/11
<i>Diagnosi associate</i>	Danno Vascolare	No	Pielonefrit e cronica	No	GPTA
<i>CD4 positività</i>	Si	No	Si	Si	Si
<b>DSA</b>					
<i>Tipo</i>	A30	DR4	A68, B12, DQ5	A11, A9, DR53	A19, A68, DQ2
<i>MFI</i>	np	1500	Classe I 2200 Classe II 1200	np	Classe I 15000 Classe II 18500

**Tabella 2:** Descrizione dei pazienti analizzati. ID: immunodepressiva; RVA : rigetto vascolare acuto, GPTA: glomerulopatia acuta da trapianto. Tac: tacrolimus; St: steroide; Eve: everolimus; MPA: micofenolato mofetile; CyA: ciclosporina; CNI: inibitori delle calcineurin; Sim: Simulect

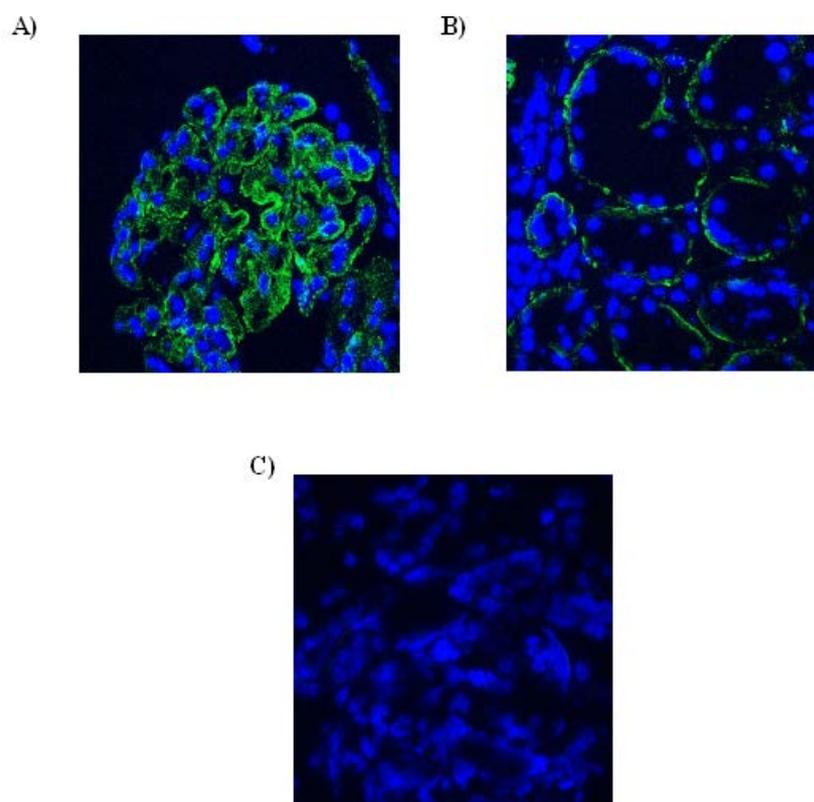
## VALUTAZIONE ESPRESSIONE CD55, CD59 e MAC a LIVELLO BIOPTICO

L'analisi in immunofluorescenza dell'espressione del MAC in pazienti affetti da AMCR ha mostrato una spiccata positività sia a livello glomerulare che a livello tubulare, con talora positività anche a livello vascolare (Figura 11 A e B). Un unico paziente è risultato negativo. Come controllo negativo è stato utilizzato un campione istologico di rene sano (Figura 11 C).



**Figura 11** A) espressione del MAC a livello glomerulare B) a livello tubulare e C) negatività in campione di rene sano.

Anche l'espressione del CD55 (Figura 12 A) e CD 59 (Figura 12 B) è risultato molto positivo sia a livello glomerulare, che intersitiziale e tubulare. Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi. Anche in questo caso come controllo negativo è stato analizzato un campione istologico di rene sano (Figura 12 C)

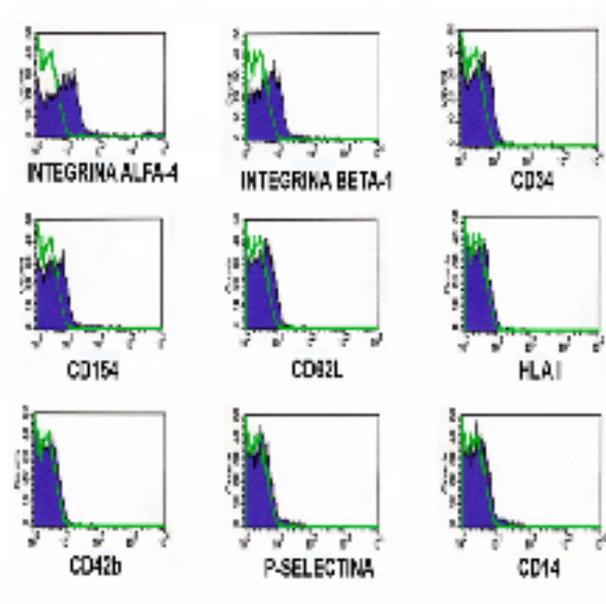


**Figura 12** A) positività di espressione del CD55 B) del CD59 e C) negatività in campione di rene sano.

## SECONDA PARTE DELLO STUDIO

### CARATTERIZZAZIONE DELLE EPC e DELLE MV DERIVANTI DALLE EPC

Il nostro gruppo ha caratterizzato le EPC e le MV isolate dalle EPC. Mediante analisi FACS sono state valutate le dimensioni delle MVs, con un valore medio di  $155 \pm 73$  nm. Con il FACS si è osservata la presenza di diverse molecole di adesione. Le MV esprimono marcatori tipici delle cellule staminali ematopoietiche quali in CD34 e molecole essenziali per l'adesione leucocitaria quali l'integrina alfa 4 e beta 1, CD154 (CD40-L) e L-selectina. Le MV non esprimono HLA di classe I né II, né marcatori di origine piastrinica (P-selectina, CD42b) o monocitaria (CD14) (Figura. 13) . Inoltre le MV trasportano differenti RNA e sono arricchite di miRNA come osservato al bioanalyzer.



**Figura 13:** Analisi FACS raffigurante l'espressione sulla superficie delle MV delle molecole Alfa4 e beta1 integrina, CD34, Cd154, L-selectina e l'assenza di marcatori leucocitari (HLA di classe I) e piastrinici (P-selectina, CD42b) e

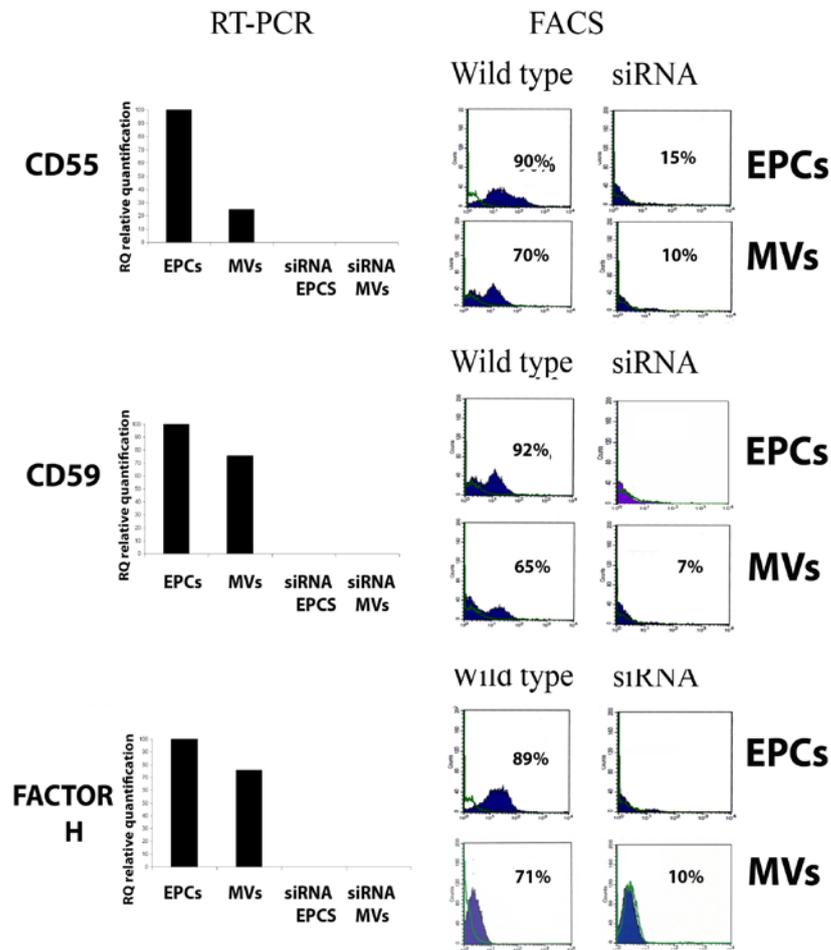
monocitari (CD14). Gli istogrammi in verde rappresentano i controllo isotipici.

### **Caratterizzazione delle EPC e delle MV per gli inibitori del complemento**

Abbiamo effettuato un'analisi in FACS e in RT-PCR per analizzare l'espressione genica delle EPC e delle MV derivanti dalle EPC in particolare per quanto riguarda la presenza di inibitori del complemento quali il Fattore H, il CD55 e il CD59.

Abbiamo dimostrato che sia le EPC che le MV sono caratterizzate dall'espressione di RNA codificante per CD55, CD59 e fattore H e da elevati livelli delle stesse proteine. Gli stessi geni sono stati silenziati con siRNA diretti verso il CD55, CD59 e Fattore H mostrando ridotti livelli dell'mRNA e delle proteine sia nelle EPC che nelle MV derivanti dalle stesse EPC (Figura 14).

Inoltre sia nelle EPC che nelle MV è stata riscontrata la presenza di miR-proangiogenetici quali miR-126 e il miR-296.



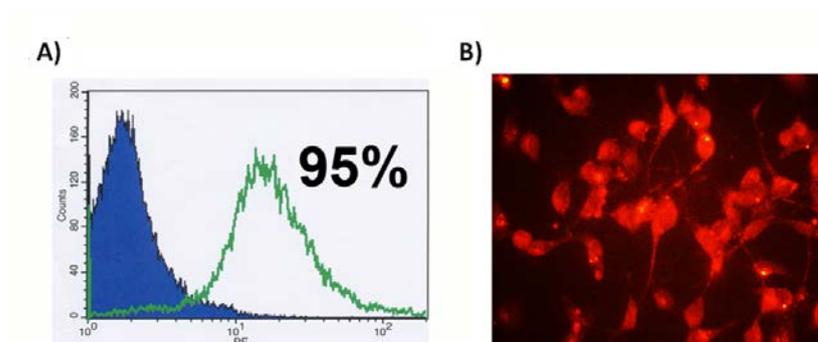
**Figura 14:** Analisi in RT-PCR e FACS dell' espressione di CD55, CD59 e fattore H nelle EPC e nelle MV wild type e nelle EPC transfettate con siRNA diretti verso gli stessi e le MV rilasciate dalle stesse EPC.

### Internalizzazione delle MV nelle cellule endoteliali glomerulari umane

Le cellule endoteliali glomerulari umane (hGECs) sono state utilizzate per ricreare un modello in vitro di danno endoteliale e studiare gli effetti biologici delle ECP e delle MV sul danno endoteliale complemento-.mediato.

L'analisi dell'internalizzazione delle MV è stata valutata in FACS, incubando tali cellule per 6 ore con 50 mcg/ml di MV colorate con PKH26, mostrando una percentuale di

internalizzazione del 95% valutata al microscopi confocale (Figura 15).



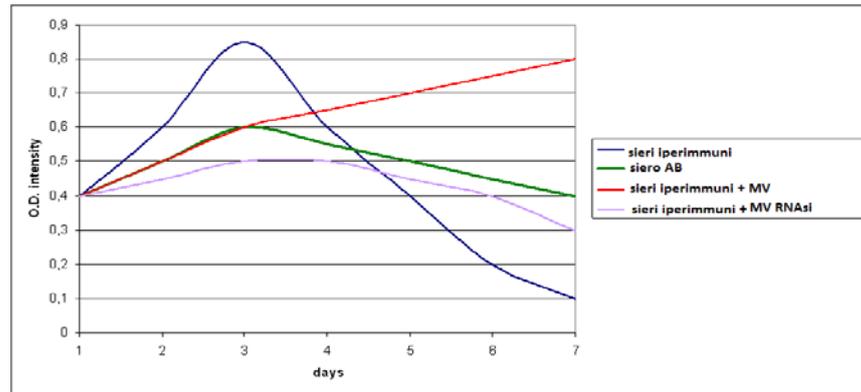
**Figura 15:** **A)** Analisi citofluorimetrica raffigurante l'internalizzazione in seguito ad incubazione per un'ora a 37°C delle MV (50µg/ml), marcate con PKH26 (istogramma verde) nelle GEC. L'istogramma in blu rappresenta il controllo negativo (cellule non incubate con MV). **B)** Immagine in microscopia a fluorescenza in cui si evidenzia l'internalizzazione da parte delle GEC di MV (50µg/ml), marcate con PKH26 (in rosso) in seguito ad incubazione per un'ora a 37°C.

## **RUOLO PROTETTIVO DELLE MV SUL DANNO ANTICORPALE COMPLEMENTO-MEDIATO A LIVELLO DELLE CELLULE ENDOTELIALI**

In letteratura è noto che il legame degli anticorpi con molecole di classe I presenti sulla superficie delle cellule endoteliali determina la proliferazione di queste ultime in modo dose-dipendente. Il principale meccanismo attraverso il quale gli anticorpi anti-HLA stimolano la proliferazione cellulare è mediante l'up-regolazione di recettori per fattori di crescita e i loro ligandi [45]

Sulla base di queste considerazioni abbiamo valutato a brevi tempistiche, mediante il test della BrdU, l'incremento della proliferazione delle GEC stimulate con sieri iperimmuni prelevati da pazienti risultati positivi alla presenza di anticorpi anti-HLA di classe I.

Nei primi tre giorni si osserva un incremento della proliferazione cellulare delle GEC (Figura 16) conseguente all'incubazione di quest'ultime con sieri iperimmuni; tale effetto potrebbe essere considerato come indice di attivazione endoteliale. Inoltre a brevi tempistiche l'analisi citofluorimetriche mostrano un aumento dell'espressione delle molecole pro-infiammatorie (Figura 17 A), mentre in condizioni di stimolazioni prolungata (4-7 giorni) si riscontra un aumento dell'apoptosi cellulare. Le GEC stimulate con siero AB di controllo o con 50ug/ml di MV presentano una proliferazione ridotta rispetto a quelle stimulate solamente con sieri iperimmuni o con MV pre-trattate con 1U/ml di RNAsi (Figura 16)



**Figura 16** Grafico raffigurante l'effetto proliferativo esercitato da sieri iperimmuni (linea blu), siero di controllo AB (linea verde), sieri iperimmuni con MV (linea rossa) e con MV RNAsi (linea viola) nelle GEC stimulate per 3 ore.

Per valutare il potenziale effetto protettivo esercitato dalle MV nel danno endoteliale complemento-mediato, è stata valutata l'espressione proteica di molecole coinvolte nella cascata del complemento (MAC) e pro-infiammatorie (E-selectina, VCAM-1, CD40) mediante analisi citofluorimetrica.

A tale scopo, le GEC sono state incubate per 12 ore con pool di sieri AB di controllo o con sieri iperimmuni in presenza o assenza di 50ug/ml di MV pre-trattate o meno con 1U/ml di RNAsi o con MV isolate da EPC trasfettate con siRNA diretti contro il CD55, CD59 e Fattore H.

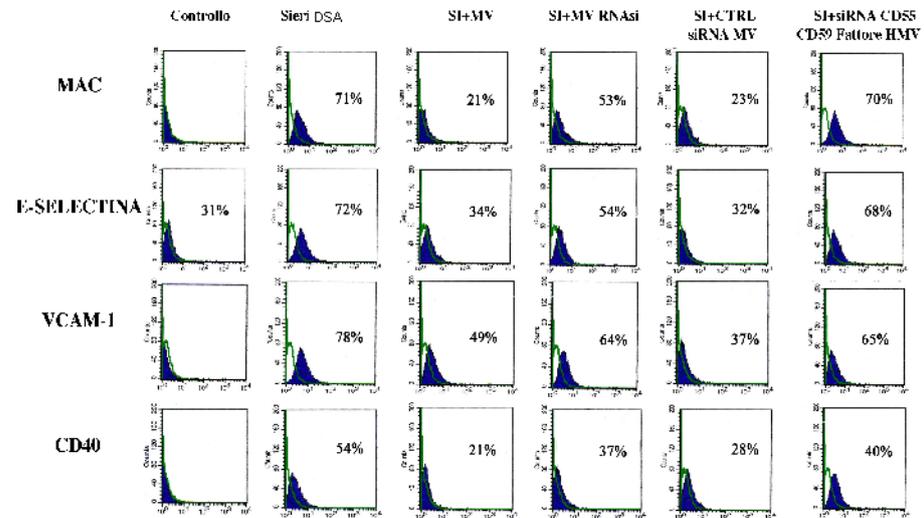
Le analisi FACS hanno dimostrato un notevole aumento dell'espressione di queste proteine nelle GEC stimulate con i sieri iperimmuni rispetto al controllo, mentre le stesse cellule incubate con 50ug/ml di MV presentavano ridotti livelli delle proteine MAC, E-selectina, VCAM-1 e CD40. Per chiarire tale andamento, sono stati condotti gli stessi esperimenti con MV trattate con RNAsi, un enzima in grado di degradare gli RNA. L'analisi FACS ha mostrato in queste cellule un aumento

dell'espressione proteica, paragonabile a quella osservata nelle GEC stimulate con sieri iperimmuni.

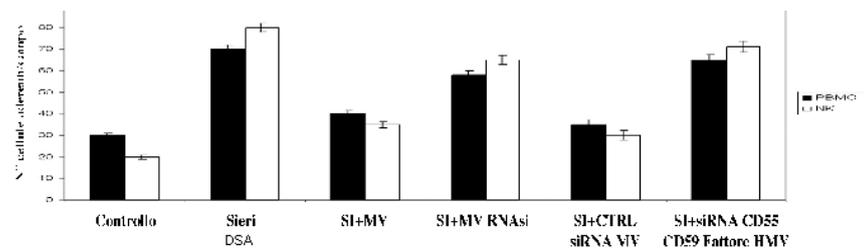
Inoltre le cellule stimulate con MV derivate da EPC pretrattate con siRNA diretti contro gli inibitori del complemento, presentavano aumentati livelli dell'espressione delle molecole infiammatorie rispetto alle GEC stimulate con MV derivate da EPC transfettate con un siRNA di controllo, privo di attività biologica. (Figura 17 A)

Per confermare l'effetto anti-infiammatorio esercitato dalle MV osservato in precedenza, abbiamo testato l'adesione dei PBMC e delle NK su un *monolayer* di GEC confluenti stimulate come già descritto. Rispetto al controllo, nei monolayer stimolati unicamente con i sieri iperimmuni si osservava un aumento del numero dei PBMC e delle NK adesi, mentre i monolayer trattati con le MV presentavano una notevole diminuzione del numero di cellule aderenti. Viceversa, le MV pre-trattate con RNAsi e le MV derivate da EPC transfettate con siRNA diretti contro il CD55, CD59 e Fattore H, non erano in grado di inibire il processo di adesione dei PBMC e delle NK sulle GEC (Figura 17 B).

A)



B)



**Figura 17.A)** Analisi citofluorimetrica raffigurante l'espressione di MAC, E-selectina, VCAM-1, CD40 nelle GEC, stimulate con sieri iperimmuni e trattate con MV (50ug/ml) pre-trattate o meno con RNAsi e con siRNA diretti contro gli inibitori del complemento. **B)** Analisi quantitativa indicante la percentuale di espressione di MAC, E-selectina, VCAM-1 e CD40 nelle GEC stimulate come precedentemente descritto. **C)** Saggio di adesione dei PBMC e delle NK sulle GEC, dopo incubazione con i sieri iperimmuni e trattamento con MV.

### Angiogenesi in vitro

La capacità pro-angiogenetica delle MV è stata testata valutando la capacità delle GEC a formare strutture simil-capillari in vitro su matrice extracellulare (MATRIGEL) in presenza o assenza di MV. In particolare, le GEC sono state stimulate con le MV per 12 ore, con sieri di controllo o con sieri iperimmuni, in presenza o assenza di 50ug/ml di MV pre-trattate o meno con 1U/ml di

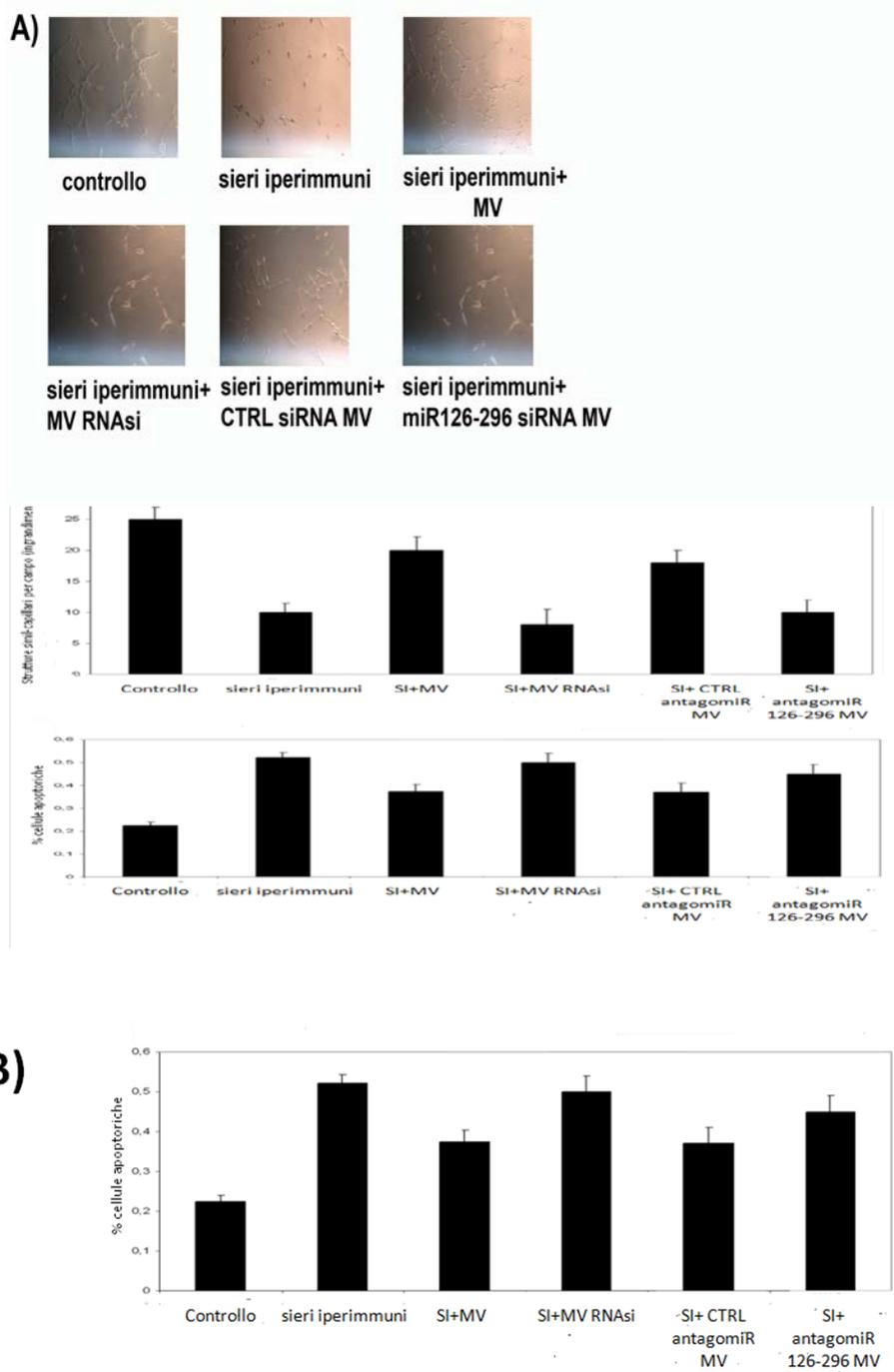
RNAsi o con MV isolate da EPC transfettate con antagomiR diretti contro i miR proangiogenici.

I dati ottenuti dall'analisi delle immagini in microscopia ottica e dalla conta vasi per campo, hanno dimostrato che le GEC spontaneamente formano strutture simil-capillari mentre l'incubazione con sieri iperimmuni causava una diminuzione del numero di capillari. Al contrario, le MV erano in grado di promuovere la formazione di un *network* vascolare completo a 12 ore dallo stimolo mentre le MV trattate con RNAsi e le MV isolate da EPC transfettate con antagomiR diretti contro i miR proangiogenici quali il miR126 e il miR 296 inibivano la formazione di capillari su MATRIGEL (Figura 18 A)

### **Analisi dell'effetto anti-apoptotico esercitato dalle MV sulle GEC**

Come ulteriore prova delle proprietà pro-angiogeniche delle MV, è stato analizzato il tasso di apoptosi delle GEC coltivate in condizioni di deprivazione sierica per 12 ore e successivamente stimulate con sieri iperimmuni in presenza o assenza di 50ug/ml di MV, pre-trattate o meno con 1U/ml di RNAsi o con MV isolate da EPC transfettate con antagomiR diretti contro i miR proangiogenici.

Le MV erano in grado di ridurre il numero di cellule apoptotiche rispetto alle cellule trattate solamente con sieri iperimmuni, mentre le MV pre-trattate con RNAsi o con antagomiR diretti contro i miR proangiogenici 126/296 abolivano tale effetto (Figura 18 B).



**Figura 18 A)** Immagini in microscopia ottica raffiguranti la formazione da parte delle GEC di strutture simil-capillari su superfici rivestite di Matrigel, stimulate con i sieri iperimmuni e con MV pre-trattate o meno con RNasi o con MV isolate da EPC transfettate con antagomiR diretti contro il

miR126/296 I risultati sono stati riportati in un grafico indicante il numero di strutture simil-capillari per campo di osservazione. **B)** Grafico raffigurante il tasso apoptotico delle GEC coltivate in condizioni di deprivazione sierica per 12 ore e successivamente stimulate come descritto precedentemente.

## TERZA PARTE DELLO STUDIO

### DESCRIZIONE DELLA POPOLAZIONE

#### Caratteristiche pre-trapianto

Tra gennaio 2007 e dicembre 2014 sono state eseguite presso in nostro Centro 1410 biopsie renali. Di queste in 137 pazienti è stata diagnosticata istologicamente cTG.

Dal punto di vista demografico i maschi rappresentavano il 64,2% (88/137); età media  $44.5 \pm 14.3$  anni. 34 pazienti (24,8%) avevano una positività pre trapianto per gli anticorpi anti\_HLA (cPRA > 20% sia verso classe I che classe II). Solo l'8% dei pazienti (11/137) erano considerabili iperimmuni (cPRA  $\geq$  80% verso classe I o II). In tutti i casi arruolati al momento del trapianto sia il cross match (eseguito in citotossicità diretta) che i DSA erano negativi. 105 pazienti (pari al 76,6%) erano riceventi di un primo trapianto. 27/137 (19,7%) erano HVC positivi.

L'incidenza complessiva di DGF è stata il 42.8 % (45/137). Il tempo mediano ischemia fredda 18.3 h (min 0.3, max 45 ore).

Per quanto riguarda il protocollo immunodepressivo di induzione, il farmaco utilizzato è stato nel 66,2% (91/137) dei pazienti l'anticorpo anti-rettore dell'IL2 (Simulect®, Novartis), nel 6.6% (9/137) le globulina anti timociti (Tymoglobulin®, Genzyme) e nel 0.7% (1/137) l'associazione tra i due farmaci. Nel 4% dei pazienti il dato non era stato riportato e pertanto non era noto.

Come immunodepressione di mantenimento (intention to treat) il 94.1% (129/137) hanno ricevuto un protocollo comprendente

gli inibitori delle calcineurine ( il 93 pazienti associati al micofenolato mofetile e steroide, in 20 solo con steroide, in 5 in associazione a mTORi e steroide e in un unico caso in monoterapia). Il 2,2% (3/137) è stato trattato con mTORi in associazione a micofenolato mofetile e steroide.

Dal punto di vista immunologico, il 53,3% (73/137) dei pazienti ha sviluppato anticorpi DSA de novo nel post trapianto. Il 17.5% (24/137) ha avuto, oltre la cTG, almeno un episodio di rigetto acuto cellulare e il 12.4% (17/137) di rigetto acuto anticorpo-mediato.

Il tempo medio di follow up è stato 11.5 anni. A fine follow up 71 pazienti (51,8%) avevano perso il trapianto (dato death censored) e 12 (8.8%) erano morti con rene funzionante.

### **Espressione degli AT1R-Ab**

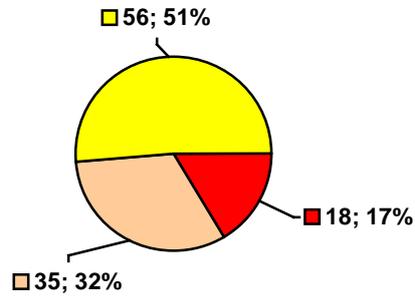
Dei 109 sieri testati pre trapianto, 18 pazienti sono risultati AT1R-Ab positivi (16,5%), 35 negativi (32,1%) e 56 a rischio (54.4%).

Dei 113 sieri disponibili al momento della biopsia, 13 pazienti sono risultati AT1R-Ab positivi (11,5%), 69 negativi (61,1%) e 31 a rischio (27.4%) (figura 19). Considerando i 13 pazienti con anticorpi al momento della biopsia, 5 di questi erano già positivi pre-trapianto, 1 era negativo, 4 a rischio. Di 3 pazienti il siero pre-trapianto non è risultato disponibile.

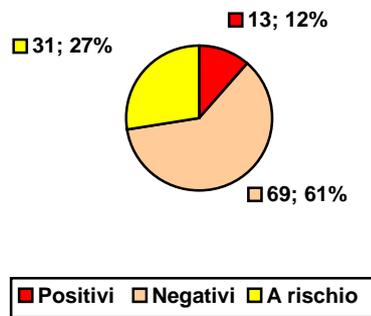
Il valore medio rilevato è stato 12 U/ml (min 2.5- max 39).

Per quanto riguarda i campioni dei 6 volontari sani analizzati, sono tutti risultati negativi con valore medio di anticorpi pari a 2 U/ml.

### AT1R-Ab pre trapianto



### AT1R-Ab al momento della biopsia



**Figura 19:** espressione degli anticorpi AT1R –Ab sia pre trapianto che al momento della biopsia renale

## Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione

### AT1R-Ab+

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti AT1R-Ab positivi e quelle dei pazienti negativi sono sovrapponibili eccetto per i dati sotto riportati.

I pazienti AT-Ab positivi o a rischio sono risultati più giovani rispetto ai negativi (rispettivamente  $42.8 \pm 17.1$  anni i positivi e

40.7 ± 14.3 i pazienti a rischio vs 48.5 ± 13.4 i negativi, p=0.034).

I pazienti sottoposti già in precedenza ad altri trapianti di rene hanno dimostrato avere maggiore probabilità di sviluppo di tali anticorpi. Infatti sono questi pazienti sono risultati PT-Ab positivi o a rischio nel 91.3%, vs il 61,6% dei pazienti al primo trapianto (p=0,001).

E' stata condotta una analisi nei pazienti HCV positivi (di 27 pazienti, disponibili solo 24 sieri). Il 83,3% è emerso essere PT-Ab positivo o a rischio (9 positivi – 37.5%- 11 a rischio – 45.8%). Invece gli 83 pazienti arruolati HCV negativi, solo il 63,8% era positivo o a rischio pre trapianto (8 positivi – 10.3% - 45 a rischi -54. 2%, p=0,05)

Per quanto riguarda invece il profilo anticorpale al momento della biopsia renale, i pazienti HCV positivi erano nel 70,9% dei casi BT-Ab positivi o a rischio (4 positivi – 16.7%- e 13 a rischio – 54. 2%) vs il 31% dei pazienti HCV negativi ( 9 positivi - 10.8% - 18 a rischio - 20.7%, p=0.001).

### **AT1R-Ab e profilo immunologico**

Nella popolazione di pazienti con cTG analizzata, il 16,8% ha avuto nella sua storia di trapianto anche almeno un evento di rigetto acuto cellulo mediato e, nel 11,2%, di rigetto anticorpo mediato. Abbiamo evidenziato una maggior incidenza di rigetto nei pazienti con AT1R-Ab. In particolare il 27,8% dei pazienti con anamnesi positiva per rigetto cellulo mediato erano positivi per PT-AB (vs il 13,5% dei pazienti senza storia di rigetto; p NS) e il 15,8% di coloro che erano BT-Ab positivi (vs il 10,9% di coloro che non avevano mai sviluppato rigetto, p NS). Valori

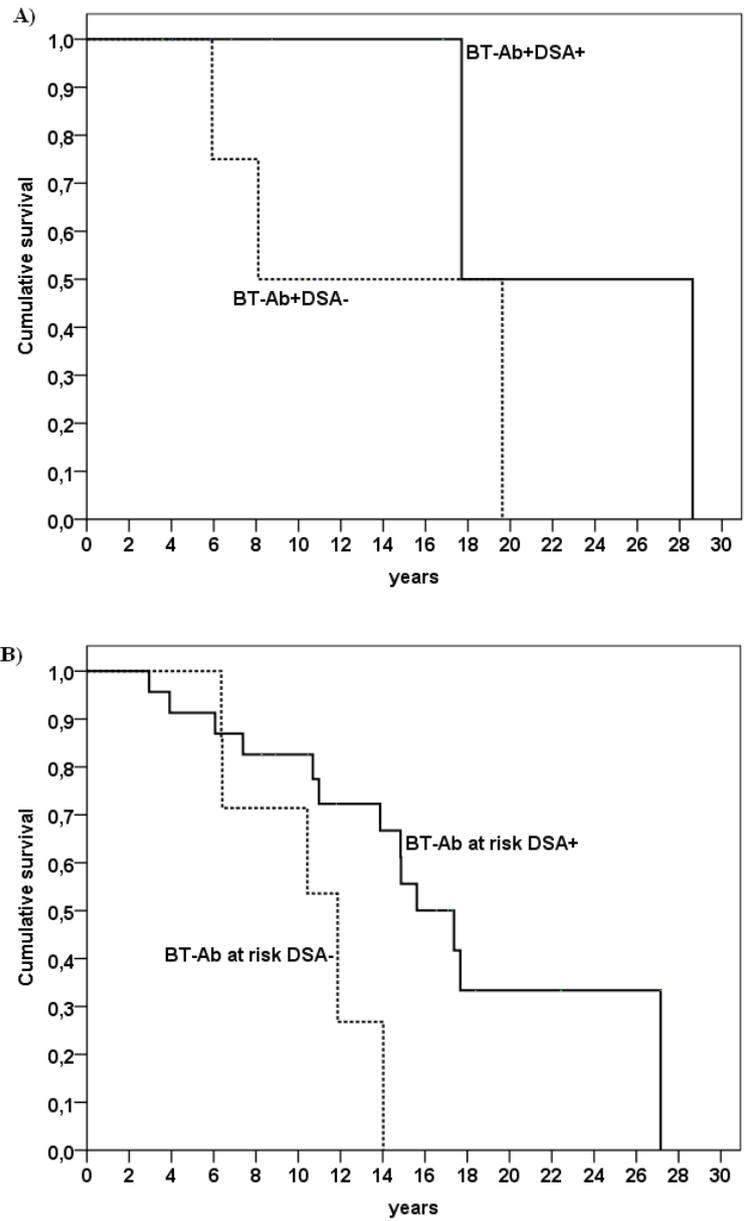
simili, anche se sempre non significativi dal punto di vista statistico, si sono confermati nei pazienti con rigetto acuto anticorpo-mediato.

L'espressione del C4d a livello dei capillari glomerulare e peritubulari, è stata dimostrata nel 42,8% dei pazienti, senza differenza sostanziali correlabili alla presenza di AT1R-Ab.

Per quanto riguarda la sopravvivenza dell'organo, la presenza o meno di AT1R-Ab non sembra influenzare né la durata del trapianto e neanche la funzionalità renale, valutata in termini di creatinina e proteinuria.

Se invece la stessa analisi viene effettuata stratificando i pazienti non solo in base alla presenza di AT1R-Ab ma anche dei DSA il risultato risulta differente. In particolare i pazienti BT-Ab+ DSA+ hanno dimostrato una sopravvivenza dell'organo (death censored) superiore rispetto ai pazienti BT-Ab+ DSA-, rispettivamente  $18.3 \pm 1.8$  anni vs  $11.6 \pm 1.7$  anni,  $p=0,19$ . Questo che pare essere solo un trend, appare invece significativo se si confrontano i pazienti BT-Ab a rischio DSA+ vs i pazienti BT-Ab a rischio DSA- : la differenza di sopravvivenza dell'organo risulta in questo caso statisticamente significativa, rispettivamente  $17,3 \pm 1.9$  anni e  $10.6 \pm 1.3$  anni,  $p = 0,02$  (figura 20)

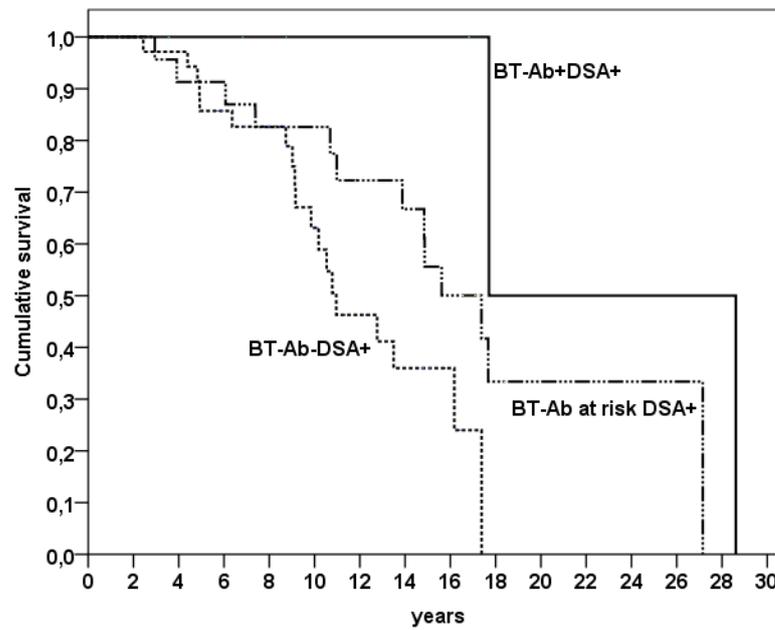
**Figura 20:** Sopravvivenza dell'organo trapiantato (death censored) nei pazienti BT-Ab+ A) BT-Ab + DSA+ dimostrano una sopravvivenza superiore rispetto ai pazienti BT-Ab+ DSA- ( $p=0.19$ ). B) La sopravvivenza è significativamente maggiore nei pazienti BT-Ab a rischio DSA+ versus BT-Ab a rischio DSA- ( $p=0.02$ )



Inoltre, la sopravvivenza dell'organo (sempre death censored) nei pazienti con DSA è significativamente maggiore nei pazienti BT-Ab positivi e a rischio vs BT-Ab negativi; rispettivamente

23.2 ± 5.5 anni, 17.3 ± 1.9 anni e 11.8 ± 0.9 anni, p= 0,02 (figura 21.)

**Figura 21:** Sopravvivenza dell'organo (death censored) nei pazienti DSA+ è significativamente maggiore nei pazienti BT-Ab + e a rischio versus BT-Ab- (p=0.02).



## ***DISCUSSIONE***

Nonostante l'evoluzione della terapia immunodepressiva utilizzata e le moderne conoscenze del danno immunologico e non immunologico nel trapianto renale, numerose cause ancora oggi determinano la perdita funzionale dell'organo trapiantato. Tra di esse, uno dei principali problemi è lo sviluppo di una alloreattività immunologica tra donatore e ricevente in grado di determinare la perdita precoce del *graft* renale. Negli ultimi anni è diventato sempre più evidente il ruolo fondamentale degli anticorpi nella risposta immunitaria diretta contro l'organo trapiantato; infatti, il rigetto anticorpo-mediato (ABMR) e in particolare il danno cronico anticorpo mediato rappresentano la causa principale di perdita funzionale del rene trapiantato dovuto al danno endoteliale mediato dall'attivazione del complemento in seguito al legame degli anticorpi donatore-specifici, in particolare diretti contro gli antigeni HLA ma anche non-HLA.

Infatti, la presenza in circolo di anticorpi anti donatore è associata a una riduzione significativa dell'emivita del rene trapiantato. Il danno complemento e non complemento-dipendente indotto dagli anticorpi può portare a una vera e propria insufficienza renale acuta, ma anche condurre alla perdita funzionale cronica del graft con l'instaurarsi della cosiddetta glomerulopatia cronica da trapianto (cTG). In tale contesto, anche i più moderni farmaci immunodepressori utilizzati appaiono poco efficaci nel bloccare la reazione anticorpo- e complemento-mediata, in quanto il loro principale meccanismo di azione è basato sull'inibizione della risposta immunitaria T-mediata. Su questa base, lo sviluppo di nuove terapie biotecnologiche e/o cellulari potrebbe condurre a un

notevole miglioramento della sopravvivenza del rene trapiantato.

Numerose evidenze scientifiche hanno messo in luce gli effetti rigenerativi delle cellule staminali derivate dal midollo osseo: tra di esse le cellule progenitrici endoteliali (EPC) hanno suscitato un ampio interesse. In particolare, le EPC circolanti nel sangue periferico rivestono una particolare importanza fisiopatologica nel paziente uremico, dal momento che l'insufficienza renale cronica è associata a una riduzione delle EPC circolanti, fatto che è considerato come una concausa dell'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari in questa popolazione. Inoltre, le EPC sono state dimostrate in grado di promuovere angiogenesi e rigenerazione tissutale in diversi modelli sperimentali di danno ischemico acuto (infarto miocardico, ictus cerebrale, ischemia arti inferiori, etc).

Recenti studi hanno evidenziato che gli effetti benefici esercitati da queste cellule staminali a livello dei tessuti danneggiati durante il rigetto d'organo sono dovuti principalmente alla loro localizzazione transiente a livello delle aree lese, suggerendo che l'effetto protettivo sia legato non tanto al differenziamento diretto in cellule mature quanto piuttosto al rilascio di mediatori paracrini coinvolti nella comunicazione cellulare tra cui le MV.

Le MV sono frammenti circolari di membrana, rilasciati come esosomi liberi a partire dal compartimento endosomale o per gemmazione della membrana plasmatica di cellule costitutivamente attive. In seguito al loro rilascio possono rimanere nell'ambiente extracellulare in prossimità della cellula di origine o far ingresso nei fluidi biologici raggiungendo siti più lontani.

Rappresentano una popolazione piuttosto eterogenea, infatti a seconda delle diverse condizioni fisiologiche e patologiche, possono variare in termini di dimensioni (0.05-1 $\mu$ m), numero, origine cellulare e composizione antigenica.

In studi recenti è stato dimostrato come esse possano comunicare con le cellule *target* mediante recettori specifici, inducendone la stimolazione in modo diretto o mediante il trasferimento di recettori di superficie. Ciò implica che le MV possano interagire solo con le cellule bersaglio che riconoscono in maniera selettiva piuttosto che con qualsiasi cellula presente nel microambiente.

Le MV veicolano materiale genetico come mRNA e miRNA. Questo tipo di trasferimento è molto interessante e potrebbe spiegare diversi fenomeni quali la riprogrammazione epigenetica.

Recentemente è stato dimostrato che le MV sono coinvolte in diversi processi biologici come la rigenerazione tissutale da parte delle cellule staminali o la progressione tumorale da parte di cellule neoplastiche mediante il trasferimento di materiale proteico o genico (mRNA e microRNA) nelle cellule target.

Il nostro gruppo ha dimostrato che le MV derivanti dalle EPC possono innescare processi angiogenetici nelle cellule endoteliali bersaglio mediante trasferimento di mRNA [36].

Nella prima parte del lavoro sono stati analizzati pazienti portatori di trapianto di rene con rigetto acuto anticorpo mediato valutando a livello bioptico l'espressione di proteine inibitorie del complemento quali CD55, CD59 e il MAC. Questi sono risultati intensamente positivi in questi pazienti sia a livello

glomerulare che tubulare, oltre a un'occasionale positività anche in sede vascolare.

Sono stati quindi valutati gli effetti delle MV secrete dalle EPC in corso di danno renale anticorpo-mediato nel contesto del trapianto renale.

A tal fine le cellule endoteliali glomerulari sono state incubate con sieri iperimmuni per ricreare in vitro un modello di danno anticorpo-mediato e stimulate o meno con le MV per valutare il loro potenziale ruolo protettivo. Queste ultime sono quindi state caratterizzate per il loro contenuto genico e proteico e si è evidenziata l'espressione di molecole pro-angiogeniche, inibitori del complemento (Fattore H, CD55, CD59) e la presenza di 157 microRNA tra cui quelli pro-angiogenici come il miR-126 e miR-296, in grado di modulare la trasduzione proteica nelle cellule target.

L'incubazione delle GEC con sieri iperimmuni causa inizialmente un'attivazione endoteliale e uno stato pro-infiammatorio caratterizzato dall'aumento dell'espressione di molecole infiammatorie come il CD40, a cui segue un aumento dell'apoptosi cellulare.

Le MV dopo essere internalizzate nelle GEC con un meccanismo L-selectina dipendente, sono in grado di inibire l'espressione del MAC, E-selectina, VCAM-1, CD40, l'adesione dei PBMC e delle NK, l'apoptosi cellulare e di promuovere l'angiogenesi.

Tali effetti vengono abrogati utilizzando MV isolate da EPC precedentemente trattate con siRNA diretti contro gli inibitori del complemento o MV pre-trattate con l'RNAsi, suggerendo così l'importanza dei miRNA e degli mRNA veicolati dalle MV

nella cellula target. In particolare gli inibitori del complemento, contenuti all'interno delle MV, potrebbero essere correlati alla diminuita espressione del MAC (principale responsabile della formazione del poro sulla membrana cellulare) nel contesto del danno anticorpo mediato, impedendo così la lisi cellulare.

Il modello in studio dovrà essere poi valutato in quella tipologia di pazienti affetti da danno endoteliale anticorpo mediato in cui è stata confermata la presenza a livello endoteliale di molecole inibitorie del complemento. Ed è proprio in questa tipologia di pazienti, in cui è dimostrato un danno complemento mediato innescato dagli anticorpi che il modello messo a punto dovrà essere applicato per verificarne l'effettiva efficacia.

Nella terza parte del lavoro ci siamo quindi concentrati sui pazienti trapiantati con diagnosi di cTG, valutando, per la prima volta in letteratura, l'incidenza e il ruolo degli AT1R-Ab in questa particolare popolazione. I nostri dati hanno dimostrato una elevata prevalenza degli anticorpi AT1R-Ab. In accordo con studi della letteratura, che hanno descritto una variabilità di prevalenza degli AT1R-Ab del 17-47% nei pazienti trapiantati di rene [56], nella nostra popolazione il 16,5% dei pazienti sono risultati positivi pre-trapianto, oltre al 51,5% di pazienti nella "zona grigia" che definisce un valore "a rischio" di espressione degli anticorpi. In modo sovrapponibile, valutando i dati al momento della biopsia, sono positivi il 11,5% dei pazienti, e il 27,4% è risultato "a rischio". La differenza riscontrata pre trapianto rispetto al momento della biopsia ci ha spinto a ipotizzare un possibile adsorbimento degli anticorpi a livello dell'organo trapiantato, così come descritto in letteratura per gli anticorpi anti HLA. Precedenti studi hanno descritto come gli

AT1RAb possano essere coinvolti nell'attivazione endoteliale sin dalle fasi precoci del post- trapianto [57,58]

D'altro canto l'immunodepressione stessa può inibire l'espressione anticorpale nel periodo post trapianto.

Nella nostra popolazione i pazienti già sottoposti a precedenti trapianti e i più giovani hanno dimostrato maggior incidenza di AT1R-Ab. Per quanti riguarda i pazienti HCV+, è noto come tale infezione può complicare negativamente la storia di trapianto. Molti studi hanno negli anni riportato una maggior incidenza in questi pazienti di rigetto acuto che di cTG che di insorgenza di glomerulonefriti de novo, proprio per una aumentata attività immunologica in questi pazienti [59]

Il pattern immunologico alterato correlate all'HCV positività può innescare la produzione di anticorpi tra cui gli AT1RAb . In tale contesto sarebbe pertanto opportuno valutare con maggior attenzione l'indicazione alla terapia antiretrovirale pre-trapianto.

La presenza degli anticorpi non sembra avere impatto sulla sopravvivenza dell'organo trapiantato, nella popolazione in esame, a differenza di altri gruppi [60] che hanno dimostrato come valori di AT1RAb pre trapianto  $> 10$  U/ml possano essere un fattore di rischio indipendente di minor sopravvivenza dell'organo. In questo studio l'associazione DSA e AT1RAb, nota in letteratura, parrebbe essere "protettiva" . Un recente studio di Coats [61] ha dimostrato come gli anticorpi anti-HLA a bassa concentrazione possano indurre l'espressione di geni protettivi, quali il HO-1, A 20 e Bcl-xl, che rendono l'endotelio meno suscettibile al danno immunologico causato dall'attivazione del complemento e dai DSA stessi. In queste

condizioni, gli anticorpi non solo non parrebbero dannosi, ma conferirebbero una sorta di “resistenza” nei confronti del danno immunologico stesso.

Per quanto riguarda invece la correlazione tra AT1RAb e rigetto acuto, dimostrata da Giral et al e Amico et al [62], nella nostra casistica i pazienti con AT1RAb positivi o a rischio, sviluppano con maggior frequenza rigetto acuti, sia cellulare che anticorpo-mediato, sebbene il dato non raggiunga la significatività statistica (probabilmente anche per la casistica piuttosto ristretta).

### ***Conclusioni***

In conclusione, in questo studio è stato dimostrato che le MV di EPC proteggono l'endotelio dal danno anticorpo- e complemento mediato attraverso un transfer orizzontale di specifici mRNA e microRNA in grado di promuovere angiogenesi e inibire apoptosi e attivazione del complemento.

I dati riportati in questo studio rivestono una notevole importanza, soprattutto in relazione alle possibili applicazioni cliniche di questi risultati. Infatti questo lavoro ha permesso di caratterizzare dal punto di vista morfologico e del contenuto proteico e genico le MV derivanti dalle cellule staminali e di valutare gli effetti che tali cellule possono mediare in un contesto fisiopatologico come il rigetto del trapianto renale. Dunque il potenziale ruolo delle MV derivanti dalle cellule staminali, come molecole di salvataggio nel rigetto renale permetterebbe di utilizzare le MV isolate dalle EPC per migliorare la funzionalità dell'organo trapiantato e impedire il rigetto anticorpo-mediato, bloccando la cascata del

complemento, favorendo la rigenerazione vascolare e riattivando l'angiogenesi .

Inoltre, la valutazione degli AT1RAb può essere utile per definire in modo completo il profilo di rischio immunologico del paziente prima del trapianto. Senza altro saranno necessari studi su casistiche maggiori per definire il ruolo di questi anticorpi nel trapianto di rene e in particolare al fine di valutare se il loro riscontro può o debba cambiare la strategia immunodepressiva del paziente, soprattutto nel contesto della cTG in cui l'approccio terapeutico rimane tutt'oggi piuttosto eterogeneo.

## ***RINGRAZIAMENTI***

Il primo ringraziamento va al Prof. Luigi Biancone, che è stato per me guida sapiente sin dai tempi in cui ero una studentessa universitaria. Molto di quello che ho imparato dal punto di vista professionale lo devo ai suoi insegnamenti.

Grazie a Caterina Dolla e Federica Civiletti che hanno lavorato con me a questo studio. Grazie a Fabrizio Fop per l'indispensabile aiuto nella parte statistica e di rielaborazione dei dati.

Un “grazie” immenso ai miei genitori e a mia sorella, che da sempre mi hanno sostenuto e incoraggiato nel mio percorso professionale e non solo.

Il ringraziamento più grande va infine a mio marito, Fabrizio, e alle mie figlie, Sara e Beatrice, che sono stati in questo percorso, come in tutto nella vita, “il mio motore e il mio caffè”!

## ***BIBLIOGRAFIA***

1. Ponticelli C. *Renal transplantation strengths and shortcomings*. Journal of Nephrology 2001;14:S1-S6.
2. Ruffoni E, Seveso M, Marson P, Tison T, Cozzi E. *Role of antibodies in kidney transplant*. G Ital Nefrol 2012; 29 (S54): S54-S60
3. Nankivell B. J, Alexander, S. I., et al. *Rejection of the kidney allograft*. N. Engl. J. Med. 363, 1451–62 (2010).
4. Colvin R. B, Smith, R. N. *Antibody-mediated organ-allograft rejection*. Nat. Rev. Immunol. 5, 807–17 (2005).
5. Halloran, P. F. *T cell-mediated rejection of kidney transplants: a personal viewpoint*. Am. J. Transplant 10, 1126–34 (2010).
6. Colvin R. B. *Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. J. Am. Soc. Nephrol. 18, 1046–56 (2007).
7. Haas M, Sis B, Racusen LC et al. *Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d negative antibody-mediated rejection and antibody associated arterial lesions*. Am J Transplantation. 2014; 14(2):272-83
8. Halloran PF, Schlaut J, Solez K et al. *The significance of anti-class I . Clinical and pathological features of renal transplant with anti-class I-like antibody*. Transplantation 1992; 53 (3): 550-5
9. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. *Chronic humoral rejection: identification of antibody mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposit in*

*peritubular capillaries*. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 574-82

10. Terasaki PI. *Deduction of fraction of immunologic and non immunologic failure in cadaveric donor transplant*. Clin Transpl 2003; 449
11. Sumitran-Holgersson S. *Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation*. Curr Opinion Ummunol 2008; 20 (5): 607
12. Dragun D, Muller DN, Brasen JH et al. *Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal allograft rejection*. N Eng J of Med 2005; 353 (6); 558
13. Besarani D, Cerundolo L, Smith JD et al. *Role of anti-vimentin antibodies in renal transplantation*. *Transplantation*. 2014 Jul 15;98(1):72-8
14. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J et al. *NK cell transcript and NK cells in Kidney biopsies from patients with donor- specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant 2010; 10: 1821-22
15. Takemoto S et al. *National Conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation*. Am J Tansplant 2004; 4: 1033.41
16. Auchincloss H & Sachs DH. *Xenogenic transplantation*. Annu Rev Immunol 1998; 16: 433-70
17. Saadi S, Platt JL. *Humoral rejection and endothelial cell activation*. Xenotransplantation 2004; 9: 239-41
18. Ogawa H et al. *Mouse-heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. Transition for*

- accommodation to tolerance. Transplantation* 2004; 77: 366-73
19. Salama AD, et al. *Transplant accommodation in highly sensitized patients: potential role for Bcl-xL and alloantibody. Am J Transplant* 2001; 1: 260-9
  20. Collins AB, et al. *Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposit in peritubular capillaries. J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2208-14
  21. Mason et al. *Decay accelerating factor induction on vascular endothelium by vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via a VEGF receptor-2 and protein Kinase c-alpha/epsilon- dependent Cytoprotective signaling pathway. J Biol Chem* 2004; 279: 41622-8
  22. Williams JM et al. *Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. Transplantation* 2004; 78: 1471-8
  23. Quesenberry, P. J. et al. *The stem cell continuum. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 228–35 (2005).
  24. Jiang, Y. et al. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature* 418, 41–9 (2002).
  25. Reynolds, B. A. & Weiss, S. *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science* 255, 1707–10 (1992).
  26. Tropepe, V. et al. *Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science* 287, 2032–6 (2000).

27. Jackson, K. A., Mi, T. & Goodell, M. A. *Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 14482–6 (1999).
28. Herrera, M. B. et al. *Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver*. Stem Cells 24, 2840–50 (2006).
29. Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I. and Lombardi G. *Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells*. Sci. Transl. Med. 2011;3,83ra42.
30. Asahara T et al. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science 1997; 275: 964-7
31. Asahara T, et al. *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Cir Res 1999; 85: 221-8
32. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication*. Leukemia. 2006 Sep;20(9):1487-95
33. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular*

- bodies and alpha-granules.* Blood. 1999 Dec 1;94(11):3791-9
- 34.** Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. *Shedding microvesicles: artefacts no more.* Trends Cell Biol. 2009 Feb;19(2):43-51. Epub 2009 Jan 12. Review
- 35.** Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest. 2004 Jun;34(6):392-401. Review
- 36.** Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA.* Blood. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
- 37.** Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Larregina AT, Morelli AE. *Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition.* J Immunol. 2008 Mar 1;180(5):3081-90.
- 38.** Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. Leukemia. 2006 May;20(5):847-56.
- 39.** Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, Farber DB. Transfer of microRNAs

- by embryonic stem cell microvesicles. PLoS One. 2009;4(3):e4722. Epub 2009 Mar 6.
40. Bussolati B, Grange C, Bruno S, Buttiglieri S, Deregibus MC, Tei L, et al. Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumoral-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res* 2006; 312:913.
  41. Slater DN, Sloam JM. The porcine endothelial cells in tissue culture. *Atherosclerosis* 1975; 21:259
  42. Basolo F, Fiore L, Calvo S, Falcone V, Conaldi PG, Fontanini G, et al. Defective interleukin six expression and responsiveness in human mammary cells transformed by an adeno 5/SV40 hybrid virus. *Br J Cancer* 1996, 73:1356
  43. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. *Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury*. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1053–1067.
  44. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, Claas F, Veale J, Jin YP, Reed EF. *Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration*. *Transplantation* 2006,82:S33-S35
  45. Stellner K, Saito H, and Hakomori SI. *Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen*. *Arch Biochem Biophys* 1973; 155: 464- 72.
  46. Eto T, Ichikawa Y, Nishimura K, Ando S, and Yamakawa T . *Chemistry of lipid of the posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. XVI. Occurrence of*

- ceramide pentasaccharide in the membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. J Biochem* 1968; 64: 205-13.
- 47.** Galili U . *The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. Biochimie* 2001; 83: 557-63.
- 48.** Good AH, Cooper DCK, Malcom AJ,et al. *Identification of carbohydrate structure wich bind human anti-porcine antibodies: implication for discordant xenografting in man. Transpl Proc.* 1992; 24:559-62
- 49.** Cerilli J, Brasile L, Galouzis T, Lempert N, Clarke J. *The vascular endothelial cell antigen system.* 1985 ; 39 : 286-289.
- 50.** Paul LC, Baldwin WM, Van Es LA. *Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation. Transplantation* 1985 ; 40 : 117-123.
- 51.** Dragun D. *Humoral responses direct against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplation. Transplantation.* 2008 ; 86 (8) : 1019-1025.
- 52.** Linquist KJ, Osterland CK. *Human antibodies to vascular endothelium. Clin Exp Immunol.* 1971 ; 9:753-760
- 53.** 15. Del Papa N, Guidali L, Sironi M. *Anti-endothelial cell antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. Arthritis Rheum* 1996 ; 39 : 758-766.

54. 16.Heurkens AH, Daha MR, Breeveld FC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid vasculitis*. Arthritis Rheum 1989;32:1191-1192.
55. Bordron A, Dueymes M, Levy Y. *The binding of some human anti-endothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis*. J Clin Invest 1998 ; 101 : 2029-2035.
56. Jobert A, Rao N, Deayton S et al. *Angiotensin II type I receptor antibody precipitatin acute vascular rejection in kidney transplantation*. Nephrology. 2015; 20:10-2
57. Ingelfinger JR. *Agonistic autoantibodies and rejection of renal allografts*. N Engl J Med. 2005;352(6):617–9.
58. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifle G. *Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy*. Transplantation. 2003;76(2):395–400.
59. Bestard O., Cruzado JM, Torras J, Gil-Vernet S, Seron D, Rama I, Grinyo JM. *Long term effect of hepatitis C virus chronic infection on patient and renal graft survival*. Transplant. Proc. 2005; 37(9):3774-7
60. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JPD, Renaudin K, Moreau A, et al. *Pretransplant Sensitization Against Angiotensin II Type I Receptor Is a Risk Factor for Acute Rejection and Graft Loss: Anti-AT1R-Abs Shorten Graft Survival*. Am J Transplant. 2013;13(10):2567–76.
61. W. Hanf, CS Bonder, PTH. Coats. *Transplant glomerulopathy: the interaction of HLA antibodies and*

*endothelium*. Journal of Immunol Research 2014. 2014: 54931-54942

- 62.** Amico P, Hönger G, Biemann D, Lutz D, Garzoni D, Steiger J, et al. *Incidence and Prediction of Early Antibody-Mediated Rejection due to Non-Human Leukocyte Antigen-Antibodies: Transplantation*. 2008;85(11):1557–63
- 63.** Xia Y, Kellems RE. Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibodies and Hypertension: Precautions and Beyond. *Circ Res*. 2013; 113(1):78-87
- 64.** Hyeyoung L, Ji II K et al. *Investigation of serum angiotensin II Type I receptor antibodies at the time of renal allograft rejection*. *Ann Lab Med* 2015; 35:314-320
- 65.** Reismoen NL. *Role of angiotensin II type I receptor-activating antibodies in solid organ transplantation*. *Hum Immunol* 2013; 74:474-7
- 66.** Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J. *Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies*. *Am J Transplant* 2013; 13:25747-89
- 67.** Dragun D, Muller DN, Brasen JH et al. *Angiotensin II type I-receptor activating antibodies in renal allograft rejection*. *NEJM* 2005; 325:558-69